



Universidad Autónoma de Madrid



Universidad Autónoma de Madrid
Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias

**Análisis del motivo de unión al dsRNA de
la proteína VP3 del virus de la Bursitis
Infecciosa y su implicación en el control de
la respuesta innata antiviral del
hospedador**

-TESIS DOCTORAL-

Idoia Busnadiago Rezola

Madrid, 2013





Universidad Autónoma de Madrid



Universidad Autónoma de Madrid
Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias

Memoria presentada para optar al grado
de Doctor en Ciencias Biológicas por

Idoia Busnadiego Rezola

Universidad Autónoma de Madrid
Enero de 2013

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. José Francisco Rodríguez Aguirre
C.N.B.-C.S.I.C.



El trabajo recogido en esta memoria ha sido realizado en el Centro Nacional de Biotecnología (C.N.B.-C.S.I.C.) bajo la dirección del Dr. José Francisco Rodríguez Aguirre. Su financiación corrió a cargo de una beca Predoctoral de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia.

AGRADECIMIENTOS

Durante los años de elaboración de esta tesis doctoral, muchas han sido las personas que han contribuido a que este trabajo viera finalmente la luz. Quisiera aprovechar estas líneas para agradecer a todos y cada uno de ellos su ayuda tanto personal como profesional ya que, sin ellos, este camino habría sido mucho más difícil, por no decir, imposible:

En primer lugar, al **Dr. José Francisco Rodríguez, “Paco”**, mi director de tesis. Gracias por darme la oportunidad de realizar esta tesis, de enseñarme a investigar, y de introducirme en el “mundo de los virus” de los que apenas sabía nada cuando llegué, pero que han resultado ser tan interesantes que han conseguido acaparar casi todo mi tiempo durante estos años.

A todos los compañeros del laboratorio **117**, a los que ya se fueron: **Nerea, Laura, Sonia, Loly, Aitor y Dani**. Y a los que lo forman en la actualidad: **Diego, Romy, Antonio, Fernando y Ana**. Gracias a todos por vuestra colaboración y apoyo, sin vosotros esta tesis no sería lo que es. **Nerea**; que podía haber estudiado ciencias sociales pero prefirió ser una excelente científica, gracias por estar siempre dispuesta a compartir tus “trucos” de trabajo y tu piso en la Latina!; **Laura** (la “Delgui”), por esas neuras y risas compartidas con un cigarro en la puerta del CNB; **Sonia**, gracias por tu paciencia y tu amistad, por poder recurrir a ti aunque fuera mal momento; **Aitor y Dani**, por estar siempre dispuestos a discutir experimentos y sobre todo, por vuestro buen humor, capaces de hacer un chiste de lo que sea!; **Loly**, la hermana mayor del labo cuando llegué; **Antonio**, por tantos y tantos recombinantes y secuencias con las que te he mareado; **Romy**, por todos esos ratos de charlas científicas y no tan científicas como señoras de escalera sentadas en el pasillo del labo; y a **Diego**, gracias por tu generosidad, por tener siempre tiempo para hablar y discutir de ciencia, por apoyarme en todos esos momentos de frustración y por ser un gran investigador del que da gusto poder aprender (sabes que toda la historia de los Patch1 y 2 no la habría montado sin ti).

Al resto de laboratorios y servicios del CNB y, sobre todo, a los colaboradores necesarios: nuestros “primos” del laboratorio **113** por todo el contrabando de reactivos y en especial a **Lolo y Ana**; al **Dr. José Ruíz Castón, “JR”**, por tus palabras de ánimo en momentos difíciles y a **Mariana y Elena** del S5; al laboratorio del **Dr. Juan Antonio García** y en especial a **Adrián Valli**, por introducirme en el increíble mundo del silenciamiento génico; al laboratorio de la **Dra. Leonor Kremer**, en especial a **Mayte**, por su profesionalidad y experiencia en los ensayos de Biacore; y al laboratorio de la **Dra. Nuria Verdaguer** en Barcelona, por darme la

oportunidad de iniciarme en ese mundo de alquimistas que es la cristalografía, y en especial a **Damià**, por todas esas tardes de ciencia oral mientras guanidilábamos todo lo que pillábamos; y a **Arnau**, porque entre los dos hacíamos un cerebro y conseguimos salir ilesos de nuestros experimentos conjuntos.

No me puedo olvidar de mencionar a **Mariana, Susana de Lucas, Laura, Susana Guerra, Ana** “la portuguesa”, **Marta** de “polandia” y **Carlos**, por hacer de la hora de la comida uno de los mejores momentos del día. **Mariana**, que me ha enseñado a hablar el “venezolano”; **Susana de Lucas**, que ha aguantado estoicamente mis pataletas y siempre ha tenido un buen consejo que darme; y **Laura**, con la que he compartido prácticamente todos los cafés que me he tomado en el CNB, va a ser duro acostumbrarse a no verte todos los días. Gracias a todas, porque vuestra amistad es una de las mejores cosas que me llevo de mis años en Madrid.

Y, finalmente, gracias a mis amigas de Donosti, “**la Kuadrilla**”, por ser un oasis en medio de la tesis en el que poder desconectar, y especialmente a **Larra y Naiara**, por vuestros ánimos y vuestra paciencia aguantando mis rollos. Mi mayor agradecimiento es para la fundación Busnadiego-Rezola (**Aita, Ama eta Miren**), porque sin vosotros yo no estaría donde estoy, gracias por vuestro apoyo incondicional, por vuestro amor y comprensión durante estos años, por ser como sois. Y, **Jorge**, que aunque sé que preferirías no ser nombrado aquí, no puedo dejar de hacerlo porque has sido el que más ha sufrido esta tesis junto conmigo, porque siempre tienes la palabra justa, por comprenderme mejor que yo misma muchas veces y por estar ahí. Porque aunque digas que no, esta tesis también es tuya.

ABREVIATURAS

α-XX: anticuerpo anti-XX	h.p.i.: horas post infección
aa: aminoácido	HRI: inhibidor regulado por grupos hemo (<i>Haem-Regulated Inhibitor</i>)
ATCC: colección americana de tipos celulares (<i>American Type Cell Collection</i>)	HT: cola de histidinas (<i>Histidine Tag</i>)
BSA: seroalbúmina bovina (Bovine Serum Albumin)	IBDV: virus de la bursitis infecciosa (<i>Infectious Bursal Disease Virus</i>)
BrEt: bromuro de etidio	IPNV: virus de la necrosis pancreática (<i>Infectious Pancreatic Necrosis Virus</i>)
CEF: fibroblastos embrionarios de pollo (<i>Chicken Embryo Fibroblast</i>)	kb: kilobase
C-terminal: carboxilo terminal	MOI: multiplicidad de infección (<i>Multiplicity Of Infection</i>)
DNA: ácido desoxirribonucleico (<i>Desoxiribonucleic acid</i>)	mRNA: ácido ribonucleico mensajero
dsRNA: ácido ribonucleico de cadena doble (double stranded RNA)	MW: peso molecular (<i>Molecular Weight</i>)
DMEM: medio de Eagle modificado por Dulbecco (<i>Dulbecco Modified Eagle's Medium</i>)	N-terminal: amino terminal
DTT: ditiotretitol	ORF: marco abierto de lectura (<i>Open Reading Frame</i>)
DXV: virus X de Drosophila (<i>Drosophila X Virus</i>)	pb: par de bases
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético (<i>Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i>)	PBS: tampón fosfato salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
FCS: suero fetal de ternero (<i>Fetal Calf Serum</i>)	PCR: reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
GCN2: quinasa de control general no desreprimible-2 (<i>General Control Non-Derepressible-2</i>)	PEG: polietilenglicol
GTP: guanosina-5'-trifosfato (<i>Guanosine-5'-Triphosphate</i>)	PERK: quinasa de retículo endoplasmático tipo PKR (<i>PKR-like Endoplasmic Reticulum Kinase</i>)
HIV: virus de la inmunodeficiencia humana (<i>Human Immunodeficiency Virus</i>)	PFU: unidad formadora de placa (<i>Plaque Forming Unit</i>)

PKR: proteína quinasa dependiente de dsRNA (<i>dsRNA-dependent Protein Kinase</i>)	poliacrilamida (<i>SDS Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i>)
RdRp: RNA polimerasa RNA dependiente (<i>RNA dependent RNA polymerase</i>)	SPR: resonancia de plasmón de superficie (<i>Surface Plasmon Resonance</i>)
RNA: ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic Acid</i>)	ssRNA: RNA de cadena simple (<i>single stranded RNA</i>)
RNasa: ribonucleasa	(+)ssRNA: RNA de cadena simple y polaridad positiva (<i>positive single stranded RNA</i>)
RNP: ribonucleoproteína (<i>RiboNucleoProtein</i>)	(-)ssRNA: RNA de cadena simple y polaridad negativa (<i>negative single stranded RNA</i>)
rBV: baculovirus recombinante (<i>recombinant Baculo Virus</i>)	UTR: región no traducida (<i>UnTranslated Region</i>)
rVV: virus vacunal recombinante (<i>recombinant Vaccinia Virus</i>)	UV: ultravioleta
T: número de triangulación	VLP: pseudopartícula viral (<i>Virus Like Particle</i>)
TBE: tampón Tris-Borato-EDTA	WR: inmunodetección de proteínas en membrana (<i>Western Blot</i>)
Tris: tri-(hidroximetil)-aminometano	
SDS: dodecil sulfato sódico (<i>Sodium Dodecil Sulfate</i>)	
SDS-PAGE: electroforesis en geles desnaturalizantes de	

ÍNDICE

ABSTRACT/RESUMEN EN INGLÉS	1
1 INTRODUCCIÓN	3
1.1. El Virus de la Bursitis Infecciosa (IBDV)	6
1.1.1. Organización genómica de IBDV	7
1.1.2. Virión IBDV	9
1.1.3. Diferencias estructurales de los birnavirus con otros virus dsRNA	10
1.1.4. La proteína VP3	11
1.2. Inmunidad innata del hospedador y mecanismos de evasión viral	13
1.2.1. Mecanismos de defensa viral frente a la apoptosis	13
1.2.1.1. IBDV y apoptosis	14
1.2.2. Mecanismos de defensa viral frente a los efectos de la producción de interferón	15
1.2.3. Mecanismos de defensa viral frente al silenciamiento de RNA	16
2 OBJETIVOS	21
3 MATERIALES Y MÉTODOS	25
3.1. Material Biológico	27
3.1.1. Células procariotas	27
3.1.2. Células eucariotas	27
3.1.3. Plantas	28
3.1.4. Plásmidos	28
3.1.5. Virus	29
3.1.5.1. Baculovirus	29
3.1.5.2. VACV	30
3.1.5.3. IBDV	31
3.1.6. Anticuerpos	31

3.2. Obtención y manipulación de material biológico	31
3.2.1. PCR	31
3.2.2. Reacciones de ligación de fragmentos de DNA	31
3.2.3. Reacciones de restricción enzimática	32
3.2.4. Generación de plásmidos recombinantes	32
3.2.4.1. Generación de los plásmidos pFBHtb-VP3P1, pFBHtb-VP3P2 y pFBHtb-VP3P1+2	32
3.2.4.2. Generación de los plásmidos pFastBacHtb-VP3K99D, -VP3R102D, -VP3K105D y -VP3K106D	32
3.2.4.3. Generación de los plásmidos pFastBacHtb-VP3K99D/R102D, -VP3K99D/K105D, -VP3K99D/K106D, VP3R102D/K105D, -VP3R102D/K106D y -VP3K105D/K106D	33
3.2.4.4. Generación de los plásmidos pFastBacHtb-VP3DXV y pFastBacHtb-VP3IPNV	33
3.2.4.5. Generación de los plásmidos pVOTE-VP3P1, pVOTE-VP3P2 y pVOTE-VP3P1+2	34
3.2.4.6. Generación del plásmido pJR101-VP3	34
3.2.4.7. Generación de los plásmidos pNTAP-P1b, pNTAP-NS1, pNTAP-VP3, pNTAP-VP3Patch1, pNTAP-VP3Patch2, pNTAP-VP3Patch1+2, pNTAP-VP3DXV y pNTAP-VP3IPNV	35
3.2.4.8. Generación del plásmido pICPPV-VP3	35
3.2.5. Obtención de Baculovirus recombinantes (rBV)	35
3.2.6. Obtención de VACV recombinantes (rVVs)	36
3.2.7. Obtención del virus WR/ Δ E3LVP3	36
3.3. Infecciones y titulaciones virales	36
3.3.1. Infección con rBV	36
3.3.2. Infección con rVV	37
3.3.3. Titulación de rVV	37
3.3.4. Infección con IBDV	37
3.3.5. Titulación de IBDV	37

3.4. Expresión y purificación de proteínas, viriones y ácidos nucleicos	38
3.4.1. Purificación de las proteínas con cola de histidinas	38
3.4.2. Expresión de proteínas recombinantes en infecciones con rVVs	38
3.4.3. Purificación de viriones de IBDV	38
3.4.4. Purificación de dsRNA de IBDV	39
3.4.5. Agroinfiltración y detección de fluorescencia en plantas	39
3.4.6. Extracción de proteínas y RNA de plantas infectadas	39
3.5. Análisis Bioquímico	40
3.5.1. Determinación de la activación de las caspasas 3 y 7	40
3.5.2. Marcaje metabólico con [³⁵ S]-Met	40
3.5.3. Ensayo de retardo de movilidad electroforética (EMSA)	40
3.5.4. Análisis electroforético en geles desnaturalizantes de poliacrilamida	41
3.5.5. Análisis electroforético en geles nativos de poliacrilamida	41
3.5.6. Análisis electroforético en geles nativos de agarosa	41
3.5.7. Análisis por filtración en gel	42
3.5.8. Electrotransferencia e inmunodetección (<i>Western Blot</i>)	42
3.5.9. Detección de RNA mediante Northern Blot	43
3.6. Análisis de la interacción de VP3-dsRNA mediante Resonancia de Plasmón de Superficie (SPR)	43
3.6.1. Preparación de los ligandos dsRNA	43
3.6.2. Análisis mediante SPR	44
4 RESULTADOS	47
4.1. Estudio de la apoptosis inducida por la expresión de VP2 y su inhibición por VP3	49
4.1.1. La expresión de VP2 induce apoptosis a través de la fosforilación de PKR y eIF2 α	49
4.1.2. La expresión de una versión dominante negativa de PKR, revierte la respuesta apoptótica inducida por VP2	52

4.1.3. La coexpresión de la proteína multifuncional VP3 previene la apoptosis inducida por la expresión de VP2	54
4.2. Implicación del motivo de unión a dsRNA de VP3 en la inhibición de apoptosis inducida por VP2	57
4.2.1. Obtención de las versiones mutantes hVP3Patch1, hVP3Patch2 y hVP3Patch1+2	57
4.2.2. Análisis de la unión al dsRNA de las proteínas mutantes hVP3Patch1, hVP3Patch2 y hVP3Patch1+2.	59
4.2.3. Análisis de la capacidad de las versiones mutantes de prevenir la apoptosis inducida por la expresión de VP2	61
4.3. Análisis de homología funcional de VP3 con la proteína E3 de VACV	63
4.4. Estudio de la función de la proteína VP3 como supresora del silenciamiento génico	66
4.4.1. VP3 funciona como supresora de silenciamiento génico en un sistema heterólogo de plantas	66
4.4.2. La expresión de la proteína VP3 reduce significativamente la generación de siRNAs primarios	68
4.4.3. Análisis de la unión a siRNAs de VP3	70
4.4.4. El motivo de unión al dsRNA de VP3 es crucial para la supresión del silenciamiento génico	71
4.4.5. La proteína VP3 reemplaza funcionalmente al supresor de silenciamiento HCPro del virus de la sharka (PPV)	73
4.5. Análisis funcional de las proteínas homólogas a VP3 de virus de la familia Birnaviridae	77
4.5.1. Análisis de la unión al dsRNA de las proteínas VP3 de IPNV y DXV	77
4.5.2. Análisis de la actividad supresora de silenciamiento génico de las proteínas VP3 de los birnavirus IPNV y DXV	79
4.6. Análisis de la interacción VP3-dsRNA mediante Resonancia de Plasmón de Superficie	80
4.6.1. Estudio de las constantes cinéticas y de afinidad en la formación del complejo VP3-dsRNA	81
4.6.2. Determinación del tamaño mínimo de dsRNA requerido por la proteína VP3 para la formación del complejo	83
4.6.3. Análisis de la contribución de cada residuo del motivo Patch1 en la unión al dsRNA	87

5. DISCUSIÓN	91
5.1. Evasión de la apoptosis inducida por la activación de PKR	94
5.2. Homología funcional de VP3 con la proteína moduladora de la respuesta innata antiviral E3 del virus vacunal VACV	97
5.3. VP3 suprime el silenciamiento génico	98
5.4. Análisis del motivo de unión al dsRNA de VP3 mediante Resonancia de Plasmón de Superficie	103
5.5. Modelos de interacción de VP3 con moléculas dsRNA de distintas longitudes	105
6. CONCLUSIONES	109
7. BIBLIOGRAFÍA	112
8. PUBLICACIONES	130

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

Figura 1. Organización genómica de IBDV	8
Figura 2. Estructura de la cápsida	9
Figura 3. Mecanismos de silenciamiento génico	17
Figura 4. Caracterización de la repuesta celular desencadenada por la expresión de VP2 en células HeLa	50
Figura 5. Efecto de la expresión de una forma dominante negativa de PKR (PKR-NP) sobre la respuesta celular inducida por la expresión de VP2	53
Figura 6. La expresión del polipéptido VP3 contrarresta las respuestas celulares inducidas por la expresión de VP2	56
Figura 7. Dímero VP3	58
Figura 8. Versiones mutantes de VP3	59
Figura 9. Ensayos de retardo de movilidad electroforética (EMSA) del dsRNA genómico de IBDV	60
Figura 10. La eliminación del motivo de unión a dsRNA de VP3 anula su capacidad de prevenir las respuestas celulares desencadenadas por la expresión de VP2	62
Figura 11. La expresión de VP3 restablece la capacidad del virus WR/ Δ E3L de crecer en cultivos de células HeLa	64
Figura 12. Replicación del virus recombinante WR/ Δ E3LVP3 en células HeLa	65
Figura 13. La proteína VP3 de IBDV suprime el silenciamiento de RNA inducido por ssRNA e inducido por dsRNA en plantas <i>N. benthamiana</i>	67
Figura 14. Ensayos de retardo de movilidad en gel (EMSA) de siRNAs de 21nt y 26nt marcados con [32 P]	71
Figura 15. Ensayos de retardo de movilidad en gel (EMSA) de siRNAs de 21nt marcados con [32 P]	72
Figura 16. El motivo de unión al dsRNA de VP3 es crucial para la actividad supresora de silenciamiento en plantas <i>N. benthamiana</i>	73

Figura 17. La proteína VP3 de IBDV es capaz de reemplazar funcionalmente a la proteína supresora de silenciamiento, HCPro, en una infección de PPV	74
Figura 18. Análisis Western blot de los tejidos de plantas que mostraron fluorescencia GFP recogidas a distintos d.p.i.	76
Figura 19. Análisis de la unión al dsRNA de los polipéptidos VP3 de los virus DXV e IPNV	78
Figura 20. Las proteínas VP3 de los birnavirus DXV e IPNV suprimen el silenciamiento de RNA inducido por dsRNA	79
Figura 21. Análisis cinético de la interacción de VP3 con dsRNAs biotinilados de diferente longitud	82
Figura 22. Esquema explicativo de los distintos procedimientos empleados en el ensayo	84
Figura 23. Unión de hVP3 a moléculas de diferentes longitudes de dsRNA biotinilado presentes en la superficie del chip	86
Figura 24. Análisis de la interacción de las proteínas hVP3wt, hVP3Patch1 y hVP3Patch2 con el dsRNA de 24nt	87
Figura 25. Análisis de la interacción de mutantes puntuales de la región Patch1 de hVP3 con dsRNA biotinilado de 24 nt	88
Figura 26. Análisis de la interacción de los mutantes dobles de hVP3 con el dsRNA de 24nt	90
Figura 27. Predicción de la estructura secundaria del transcrito del gen VP2	96
Figura 28. Modelo de interacción VP3-21ntsiRNA	105
Figura 29. Modelo de interacción VP3-dsRNA genómico	106

TABLAS

Tabla 1. Generación de plásmidos recombinantes con una o dos mutaciones puntuales	33
Tabla 2. Oligonucleótidos RNA empleados en el ensayo de SPR	44
Tabla 3. Constantes de velocidad de asociación (k_a), disociación (k_d) y de afinidad al equilibrio (K_D) para la interacción hVP3-dsRNA	74

ABSTRACT/RESUMEN EN INGLÉS

Infectious bursal disease virus (IBDV) is an avian pathogen responsible for an acute immunosuppressive disease that causes major losses to the poultry industry. IBDV belongs to the *Birnaviridae* family, which includes nonenveloped viruses possessing a bisegmented double-stranded RNA (dsRNA) genome enclosed within a single icosahedral T = 13 capsid lacking the characteristic T = 2 core present in all known icosahedral dsRNA viruses that isolates the virus genome and replicative intermediates from host sensors. The inner space of birnavirus virions is occupied by ribonucleoprotein (RNP) complexes formed by the genomic dsRNA segments entirely wrapped up by molecules of the virus encoded VP3 polypeptide and covalently linked to the VPg form of the viral RNA-dependent RNA-polymerase. Previous reports have demonstrated that these RNPs are transcriptionally active *in vitro* and *in vivo* in the absence of an intact capsid and this suggests the possibility that the RNPs might be released and act as capsid-independent transcriptional complexes. In this regard, we raised the hypothesis that the VP3 polypeptide might play a role shielding the dsRNA against cellular dsRNA sensors, and thus preventing the onset of dsRNA-mediated innate immune responses.

Previous reports evidenced that expression of the mature VP2 IBDV capsid polypeptide triggers a programmed cell death response. Our results demonstrate that coexpression of the VP3 polypeptide precludes phosphorylation of both PKR and eIF2 α induced by VP2 expression. Further experiments showed that VP3 functionally replaces the host-range vaccinia virus (VACV) E3 protein, thus allowing the E3 deficient VACV deletion mutant WR/ Δ E3L to grow in non-permissive cell lines. We also show that when analyzed in a plant-based experimental model, VP3 prevents the silencing-mediated degradation of a reporter mRNA and can functionally replace the well characterized HCPro silencing suppressor of *Plum pox virus*, a potyvirus that is unable to infect plants in the absence of an active silencing suppressor. We also demonstrate that the anti-apoptotic and anti-silencing activities of VP3 rely on its dsRNA binding capacity. Finally, through the employment of surface plasmon resonance (SPR) analysis, we obtained the kinetic constants of the VP3-dsRNA interaction and determined that K99 and K106 are the key VP3 residues for binding the dsRNA.

According to results presented here, VP3 can be categorized along with other well characterized proteins such as VACV E3, avian retrovirus sigmaA, and influenza virus NS1 as a virus-encoded dsRNA-binding polypeptide with antiapoptotic properties. Our results suggest that VP3 plays a central role in ensuring the viability of the IBDV replication cycle by preventing programmed cell death protecting the viral genome from host sentinels.

1 INTRODUCCIÓN

Análisis del motivo de unión al dsRNA de la proteína VP3 del Virus de la Bursitis Infecciosa y su implicación en el control de la respuesta innata antiviral del hospedador

Las partículas virales son estructuras biológicas extremadamente simples y, sin embargo, constituyen un modelo de complejidad, ya que, como parásitos intracelulares obligados, los virus han desarrollado mecanismos muy diversos para reclutar, adaptar, modificar y usurpar la maquinaria celular. La replicación viral tiene lugar en presencia de potentes mecanismos antivirales capaces de prevenir la infección. Los virus combaten esta respuesta codificando proteínas y moléculas de RNA que interaccionan e interfieren con el sistema inmune celular. Como resultado de la presión evolutiva extrema a la que se encuentran sometidos, los mecanismos de control desarrollados por los virus son extraordinariamente diversos y muchas veces específicos para cada especie de virus y hospedador.

El RNA de cadena doble (dsRNA) actúa como una potente señal para la inducción de mecanismos de defensa intracelular innata en eucariotas superiores. El dsRNA se encuentra en forma de genoma viral en células infectadas con virus dsRNA pero también se produce como intermediario de replicación en virus RNA con genomas de cadena sencilla (ssRNA), o como producto de la transcripción en algunos virus con genoma DNA (Weber y col. 2006). Entre los mecanismos de defensa antiviral activados por la presencia de dsRNA se incluyen: la inducción de apoptosis, la producción de interferón, la modificación de los mecanismos de traducción celular e incluso, el silenciamiento de RNA (Jacobs y Langland 1996; Gitlin y Andino 2003).

El presente trabajo se ha centrado en el estudio de la proteína VP3 del virus de la Bursitis Infecciosa (IBDV), una proteína multifuncional de unión al genoma dsRNA viral que participa en múltiples etapas del ciclo viral. El objetivo central del proyecto descrito en la presente memoria ha consistido en el estudio del posible papel de esta proteína en el control de la respuesta innata antiviral del hospedador.

1.1. El Virus de la Bursitis Infecciosa (IBDV)

IBDV es el agente causal de la enfermedad de la bursitis infecciosa (van den Berg y col. 2000), una enfermedad aguda y altamente contagiosa que afecta formas juveniles de gallina doméstica (*Gallus gallus*) provocando la destrucción de las células linfoides en la bolsa de Fabricio, un órgano linfoide que sólo se encuentra en aves y en el que se produce maduración de los linfocitos B (Kaufer y Weiss 1980). Los pollos son susceptibles a la enfermedad durante las primeras semanas de vida. Los individuos infectados sufren una inflamación severa de la bolsa de Fabricio, hemorragia muscular y, frecuentemente, la muerte (Cheville 1967). Esta enfermedad es considerada una de las patologías de mayor importancia para la avicultura debido a las pérdidas económicas que ocasiona tanto por su alta tasa de mortalidad como por su efecto inmunosupresor que aumenta significativamente la susceptibilidad a otros patógenos oportunistas y disminuye la eficacia de las vacunas frecuentemente empleadas para el control de otros patógenos, como los virus de la enfermedad de Newcastle, la enfermedad de Marek o de la bronquitis infecciosa (Becht 1980; van den Berg y col. 2000).

IBDV se caracteriza, además, por ser muy resistente a tratamientos desinfectantes como la inactivación química o por calor. Hasta la fecha, el control de la bursitis infecciosa se ha basado en la utilización de programas vacunales intensivos con vacunas vivas (Negash y col. 2004). Sin embargo, el uso masivo de este tipo de vacunas parece estar directamente relacionado con la rápida diseminación global de la enfermedad (Yamaguchi y col. 2000), ejemplificada por la detección de anticuerpos neutralizantes frente a IBDV en muestras de suero de pingüinos emperador (*Spheniscidae aptenodytes*) procedentes de colonias antárticas (Gardner y col. 1997). Por otra parte, los sistemas de vacunación empleados parecen ser responsables en alguna medida de la aparición de cepas muy virulentas (con tasas de mortandad superiores al 90%) de IBDV (van den Berg y col. 2000). Por lo tanto, es necesario el desarrollo de nuevas estrategias para controlar la enfermedad, especialmente en los países subdesarrollados donde el pollo constituye la base proteica de la dieta y en los que el mantenimiento de programas de vacunación tan complejos y costosos como los actuales resulta prácticamente inviable.

1.1.1. Organización genómica de IBDV

El genoma de IBDV consta de dos segmentos de dsRNA de 3,2 kb (segmento A) y 2,8 kb (segmento B) (Müller y col. 1979; Müller y Nitschke 1987a) con regiones no codificantes (UTR) relativamente cortas en sus extremos 5' y 3' (Figura 1). El proceso de transcripción del dsRNA viral se lleva a cabo de forma semiconservativa (Spies y col. 1987), siendo la hebra positiva desplazada por el RNA de nueva síntesis.

El segmento A contiene dos marcos abiertos de lectura (ORF) parcialmente solapantes y su transcripción genera un RNA mensajero (mRNA) bicistrónico. El primer ORF codifica un pequeño polipéptido (VP5, 145 aa, 17 kDa) no estructural que es dispensable para la replicación del virus en cultivo, pero que se ha asociado con la diseminación y la virulencia viral (Mundt y col. 1997; Lombardo y col. 2000). El ORF codifica una poliproteína (107 kDa) que sufre un procesamiento autoproteolítico cotraduccional que da lugar a la liberación de tres polipéptidos: el precursor de la proteína de la cápsida, pVP2 (512 aa, 54 kDa); la proteasa viral responsable del procesamiento proteolítico, VP4 (244 aa, 25 kDa); y la proteína multifuncional VP3 (256 aa, 28 kDa) (Kibenge y col. 1997; Sánchez y Rodríguez 1999).

Los 71 residuos C-terminales de pVP2 son posteriormente procesados por varios eventos proteolíticos: el procesamiento por VP4 en dianas secundarias Ala-Ala en las posiciones 487, 494 y 501 (Sánchez y Rodríguez 1999; Da Costa y col. 2002) y el procesamiento entre las posiciones 441 y 442 gracias a la actividad endopeptidasa de la propia pVP2 (Irigoyen y col. 2009). Para el correcto ensamblaje de la cápsida es necesaria la actividad de una aminopeptidasa sensible a puromicina (PurSA) codificada por el hospedador. Esta proteasa procesa el precursor pVP2 entre los residuos 452-453 dando lugar a una forma intermedia de pVP2, VP2-452, esencial para el ensamblado de pentámeros formados por trímeros de pVP2 (Irigoyen y col. 2012). La proteína VP3 actúa como elemento de andamiaje molecular controlando el ensamblaje de los hexámeros de trímeros de pVP2. Durante la fase de maduración de la cápsida se produce un proceso de autoproteolisis que da lugar a la forma madura, VP2 (441 aa), de la proteína de la cápsida (Chevalier y col. 2002).

Los pequeños polipéptidos generados durante el procesamiento de pVP2 quedan retenidos en la partícula viral (Da Costa y col. 2002) y poseen la capacidad de desestabilizar membranas, tanto sintéticas como biológicas, y formar poros en las mismas, por lo que se ha sugerido su posible implicación en el proceso de internalización del virus (Chevalier y col. 2005; Galloux y col. 2007).

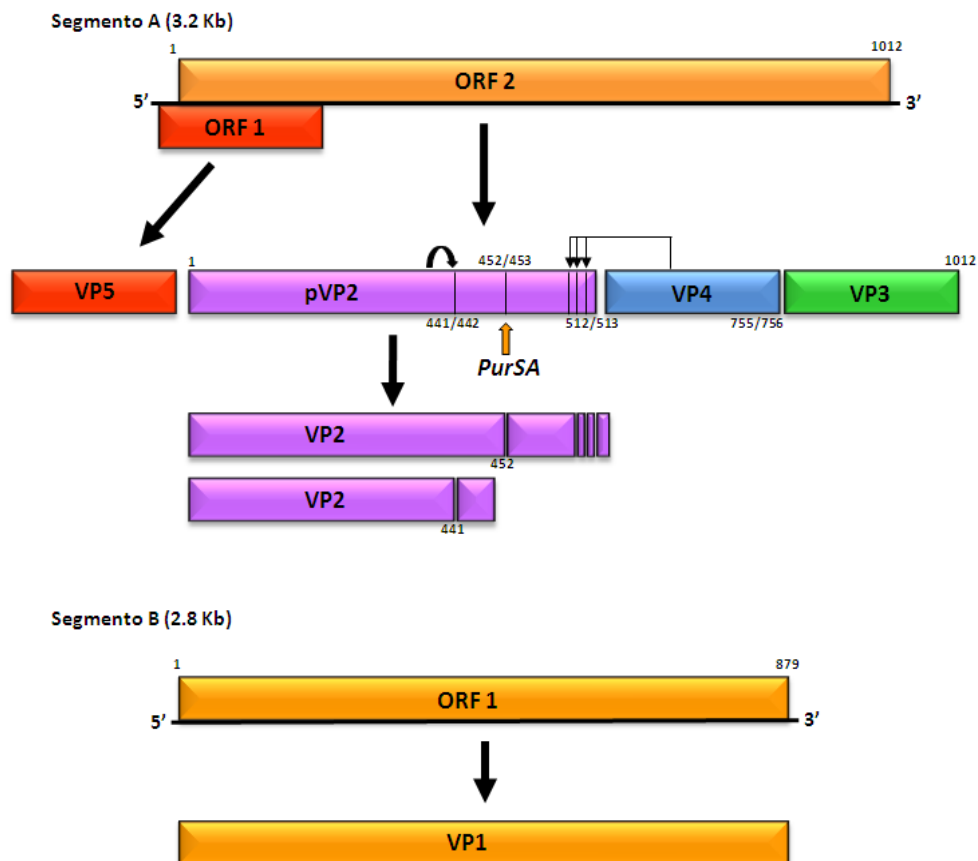


Figura 1. Organización genómica de IBDV. El segmento A contiene dos marcos abiertos de lectura (ORF) que codifican la proteína VP5 y la poliproteína viral, respectivamente. La poliproteína es cotraduccionalmente procesada por VP4, la proteasa viral, para dar lugar a las proteínas pVP2, VP3 y VP4. pVP2 es postraduccionalmente procesada en su extremo C-terminal: por VP4 en dianas secundarias Ala-Ala; por una aminopeptidasas sensible a puromicina (PurSA) del hospedador para dar lugar a la forma intermedia VP2-452 ; y finalmente, por la actividad endopeptidasa de la propia pVP2 para dar lugar a la forma madura VP2-441. El segmento B contiene un único ORF que codifica la RNA-polimerasa RNA-dependiente (RdRP), VP1

El segmento B (2.8 kb) contiene un ORF que codifica la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) viral denominada VP1 (879 aa, 97 kDa) (Muller y Nitschke 1987b; Morgan y col. 1988; von Einem y col. 2004). VP1, al igual que las polimerasas de otros virus dsRNA, cataliza la transcripción y replicación del genoma viral (Spies y col.

1987; Pan y col. 2007), procesos en los que la síntesis del RNA es iniciada mediante el cebado proteico del RNA molde (Spies y Muller 1990). Normalmente, la polimerización y el cebado del RNA suelen llevarlos a cabo distintos componentes virales, sin embargo, en los birnavirus la polimerasa realiza ambas funciones. La proteína VP1 posee la capacidad de autoguanidilarse, lo que le permite actuar como cebador para el inicio de la síntesis de RNA (Spies y Muller 1990; Dobos 1993; Xu y col. 2004). Tras esta reacción, la polimerasa VP1 que ha actuado como cebador permanece covalentemente unida al extremo 5' del RNA viral de nueva síntesis. Esta forma de VP1 se denomina VPg.

1.1.2. Virión IBDV

IBDV es un virus icosaédrico de 65-70 nm de diámetro carente de envuelta lipídica. La reconstrucción de imágenes obtenidas por criomicroscopía electrónica ha permitido la resolución de la estructura tridimensional de la partícula viral y ha mostrado que los viriones poseen una única cápsida proteica (Böttcher y col. 1997; Castón y col. 2001) con simetría $T = 13I$ (Figura 2) compuesta por 260 trímeros cuasi-equivalentes de VP2 organizados en 12 pentámeros y 120 hexámeros (Coulibaly y col. 2005; Saugar y col. 2005; Luque y col. 2007).

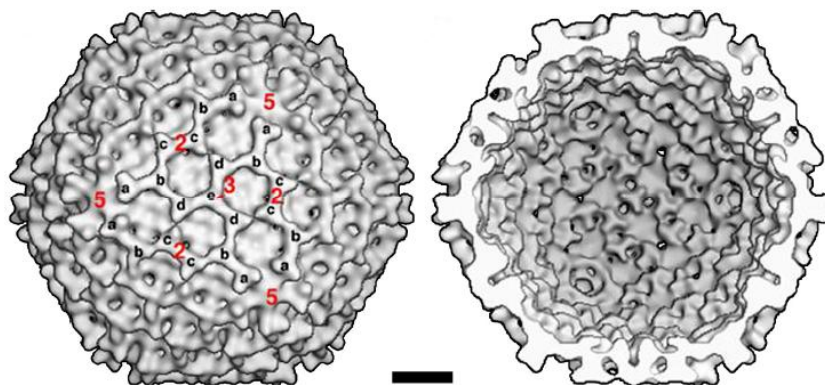


Figura 2. Estructura de la cápsida. Estructura tridimensional de la partícula de IBDV mostrando sus caras externa (A) e interna (B) a una resolución de 26 Å (Castón y col. 2001). En una cara fundamental del icosaedro se indican las diferentes clases de capsómeros triméricos (a-e) y los ejes de simetría de orden 5, 3 y 2. La barra de escala corresponde a 10 nm.

La proteína VP2, contiene marcadores de virulencia y patogenicidad (Brandt y col. 2001; van Loon y col. 2002), así como epítomos para anticuerpos neutralizantes (Schnitzler y col. 1993). El análisis de la estequiometría de los componentes estructurales de IBDV ha demostrado que existen un total de 780 copias de VP2 en la partícula viral, 450 copias de VP3 y 12 copias de la polimerasa viral VP1 (Luque y col. 2009). A partir de células infectadas y mediante centrifugación en gradientes de cloruro de cesio es posible aislar hasta seis poblaciones virales que comparten una misma estequiometría proteica pero que contienen cantidades crecientes de complemento genómico. Las poblaciones de viriones, que poseen la densidad de flotación más elevada y una mayor capacidad infectiva, son heterodiploides conteniendo cuatro segmentos de dsRNA genómico (Luque y col. 2009).

1.1.3. Diferencias estructurales de los birnavirus con otros virus dsRNA

Los virus dsRNA constituyen un grupo muy diverso que abarca desde los reovirus de mamíferos hasta el bacteriófago $\phi 6$ pasando por diversos virus de hongos. Estos virus pueden tener una o varias cápsidas proteicas concéntricas y todos ellos, con la única excepción de los birnavirus, comparten la presencia de una cápsida especializada denominada núcleo (*Core*) transcripcional con simetría T=2 (Reinisch y col. 2002). Esta cápsida, que contiene todos los elementos necesarios para la síntesis, modificación post-transcripcional y extrusión de los mRNAs virales, permanece intacta durante todo el ciclo viral. Tanto la replicación como la transcripción del genoma dsRNA tienen lugar en el interior del núcleo transcripcional y los mRNAs virales son extruidos al citoplasma celular a través de orificios localizados en los ejes pentaméricos de esta estructura (Lawton y col. 1997). Además de su papel en el metabolismo de RNA, las cápsidas T=2 juegan un papel esencial evitando el reconocimiento del genoma viral por parte de los sensores celulares, previniendo de esta forma la activación de la respuesta innata antiviral desencadenada por dsRNA.

Los miembros de la familia *Birnaviridae* carecen de un núcleo transcripcional interno (Böttcher y col. 1997; Coulibaly y col. 2005; Castón y col. 2008). Los virus mejor estudiados de la familia *Birnaviridae* son IBDV y el virus de la necrosis pancreática (IPNV), un virus que infecta diversas especies animales de vida acuática (Dobos y col.

1979; Blake 1995). Se ha demostrado que el espacio interno de la cápsida de ambos virus se encuentra ocupado por complejos ribonucleoproteicos (RNPs) formados por los segmentos genómicos asociados en toda su longitud a la proteína VP3 y cuyos extremos 5' se encuentran unidos covalentemente a la forma VPg de la proteína VP1 (Hjalmarsson y col. 1999; Luque y col. 2008). Estudios realizados en nuestro laboratorio demostraron que los RNPs purificados son transcripcionalmente activos *in vitro* (Luque y col. 2008).

Los birnavirus deben emplear algún mecanismo alternativo para suplir la carencia de una cápsida T=2. Este mecanismo podría basarse la utilización de la cápsida T=13, que se mantendría intacta a lo largo del ciclo replicativo viral actuando de forma similar a los núcleos transcripcionales T=2 presentes en el resto de los virus dsRNA, o bien mediante la protección del dsRNA genómico por parte de alguno de los elementos presentes en los RNPs virales. Experimentos realizados recientemente en nuestro laboratorio han demostrado la transfección del genoma viral de IBDV a células que expresan versiones recombinantes de las proteínas VP3 y VP1 da lugar a la correcta expresión de las proteínas virales y a la producción de viriones infectivos de IBDV (Dalton RM, comunicación personal) indicando que la replicación viral tiene lugar de forma correcta en ausencia de las cápsida T=13. Esta observación sugiere que, al igual que ocurre con otras proteínas virales de unión a dsRNA como las proteínas NS1 del virus de la gripe (Tan y Katze 1998) o E3 del virus vacunal (VACV) (Romano y col. 1998), la proteína VP3 podría actuar enmascarando las moléculas de dsRNA viral frente a los sensores celulares y controlando de esta manera la respuesta innata antiviral del hospedador.

1.1.4. La proteína VP3

Los virus poseen una capacidad de codificación limitada que requiere una optimización máxima de su información genética, lo que les permite llevar a cabo múltiples funciones esenciales para el correcto funcionamiento de su ciclo replicativo. Los virus de la familia *Birnaviridae*, con sólo cinco proteínas maduras (VP1-5), son capaces de hacer frente a las diferencias estructurales, genéticas y biológicas que los diferencian de los demás virus dsRNA y progresar eficientemente en una gran variedad

de organismos. Una de las proteínas clave respecto a la optimización de recursos genéticos es la proteína VP3, una proteína multifuncional que participa en prácticamente todos los procesos del ciclo de replicación viral.

VP3 (29 KDa) es una proteína estructural que carece de homólogos virales o celulares conocidos (Casañas y col. 2008). Además de su participación en el ensamblaje y funcionamiento de los RNPs que ocupan el espacio interior de la cápsida (Luque y col. 2008), se ha determinado que interacciona con la proteína VP1 siendo responsable de su encapsidación (Lombardo y col. 1999, Maraver y col. 2003a) y de su activación mediante la inducción de un cambio conformacional que desbloquea el dominio catalítico de la ésta (Garriga y col. 2007). Finalmente, se ha determinado que VP3 actúa como elemento de andamiaje crucial durante la morfogénesis de la cápsida gracias a su interacción con el extremo C-terminal del precursor pVP2 (Maraver y col. 2003b; Oña y col. 2004). Mediante técnicas de cristalografía de proteínas se ha resuelto la estructura atómica de su región central (residuos 92-220) (Casañas y col. 2008). Esta región, que consta de dos dominios helicoidales unidos por un largo bucle flexible, da lugar al ensamblaje de una estructura dimérica. Las comparaciones estructurales realizadas revelaron que la arquitectura general del primer dominio de VP3 constituye un nuevo tipo de plegamiento que carece de homologías significativas con otros dominios proteicos de estructura conocida. Por el contrario, el segundo dominio muestra similitudes estructurales significativas con distintos factores implicados en la regulación transcripcional (Casañas y col. 2008).

La interacción de la proteína VP3 con el dsRNA fue inicialmente descrita en estudios realizados en nuestro laboratorio con anterioridad a la resolución de su estructura tridimensional. La generación de mutantes de delección permitió la identificación del dominio de interacción en una región localizada entre los residuos 99 y 122 de la proteína (Kochan y col. 2003). Sin embargo, al comienzo de este trabajo se desconocía qué residuos eran responsables de dicha interacción.

Con la información disponible, en el presente estudio hemos trabajado sobre la hipótesis de que VP3 podría estar implicada en el control de la respuesta innata antiviral del hospedador gracias a su capacidad de interacción con el dsRNA.

1.2. Inmunidad innata del hospedador y mecanismos de evasión viral

La replicación viral tiene el potencial de alterar la homeostasis de la célula hospedadora debido al complejo conjunto de interacciones que se producen entre la maquinaria celular y los productos virales. Cada etapa del ciclo de replicación viral es susceptible de activar mecanismos de defensa antiviral del hospedador como la inducción de apoptosis, la producción de interferón, o el silenciamiento de RNA (Jacobs y Langland 1996; Gitlin y Andino 2003) y los virus han desarrollado muy diversos mecanismos para evadir estas respuestas.

1.2.1. Mecanismos de defensa viral frente a la apoptosis

La muerte celular programada (MCP) o apoptosis, es un proceso genéticamente controlado diseñado para la eliminación de células durante el desarrollo cuando éstas son redundantes. Este proceso también se activa como respuesta de emergencia frente a diferentes estímulos como el daño por radiación o el crecimiento aberrante inducido por la activación de oncogenes (Teodoro y Branton 1997), así como primera línea de defensa para detener la replicación viral. Aunque la apoptosis es generalmente un mecanismo muy eficaz que reduce la producción de progenies virales, en algunos casos puede contribuir a la diseminación y patogenicidad (Kepp y col. 2009).

La apoptosis se desencadena tras la activación de una familia de cisteín-proteasas genéricamente conocidas como caspasas. La activación de caspasas puede ocurrir a través de dos rutas de señalización diferentes pero interrelacionadas (Chowdhury y col. 2006). La ruta intrínseca, también conocida como ruta mitocondrial, se activa tras la detección por parte de las proteínas de la familia Bcl-2 de diferentes tipos de estímulo dando lugar a la formación del apoptosoma que activa las proteasas efectoras, caspasa-3 y -7 (Festjens y col. 2006). La ruta extrínseca, o ruta mediada por receptor, se activa por la unión de ligandos (Fas, $\text{TNF}\alpha$, etc.) a los receptores en la membrana celular. Esto da lugar a la formación del complejo DISC (*Death-induced signaling complex*) que induce la activación de la caspasa-8 (Juo y col. 1998). En algunos tipos celulares, la activación de la caspasa-8 da lugar a la activación directa de las caspasas efectoras -3 y -7, mientras que en otros, se requiere la amplificación de la

señal a través de la estimulación de la ruta mitocondrial por la proteína Bid, un miembro de la familia Bcl-2 (Yin 2006). La cascada proteolítica mediada por las caspasas representa un punto central de la respuesta apoptótica y su iniciación está estrechamente regulada por una variedad de factores (Hengartner 2000).

Los virus incorporan una gran variedad de mecanismos moleculares para contrarrestar y/o manipular la respuesta apoptótica del hospedador. Algunos virus inducen apoptosis en las células infectadas. Así el virus de la gripe activa la ruta mitocondrial mediante la fosforilación de BAD (Tran y col. 2012), y la proteína HBx del virus de la hepatitis B interacciona directamente con CED-9, una proteína de la familia Bcl-2 (Geng y col. 2012). Por el contrario, otros virus emplean mecanismos para inhibir la inducción de apoptosis. Por ejemplo los productos de los genes p35 e *iap* de baculovirus, inhiben la activación de caspasas (Clem y col. 1994), el virus Epstein-Barr induce la sobreexpresión de Bcl-2 (Henderson y col. 1991) y el virus de la viruela bovina bloquea la apoptosis inducida por Fas y por TNF α mediante la expresión de un inhibidor de proteasas (Tewari y Dixit 1995).

1.2.1.1. IBDV y apoptosis

Estudios llevados a cabo en aves infectadas por IBDV sugieren que el virus induce apoptosis tanto en los linfocitos de la bolsa de Fabricio como en células adyacentes no infectadas, y todo esto contribuye a la rápida disminución de los linfocitos B, la destrucción de la bolsa de Fabricio y la inmunosupresión (Müller 1986; Burkhardt y Müller 1987). Estudios realizados en fibroblastos embrionarios de pollo (CEF) mostraron que, en este tipo celular, IBDV induce apoptosis durante la fase tardía de la replicación viral, tras el ensamblaje de la progenie viral (Jungmann y col. 2001).

Dos polipéptidos de IBDV, VP5 y VP2, han sido relacionados con la inducción y el control de la respuesta apoptótica inducida por IBDV. El papel de VP5 no está todavía claro aunque se ha descrito que inhibe la apoptosis durante las primeras etapas de la infección (Liu y Vakharia 2006) y, posteriormente induce la lisis celular acumulándose en la membrana plasmática (Lombardo y col. 2000). Se ha descrito que VP5 interacciona con una proteína denominada canal aniónico-2 dependiente de voltaje (*Voltage-dependent anion channel 2*; VDAC2) (Li y col. 2012) y con la subunidad

p85 α de la fosfatidil-inositol-3-quinasa (PI3K) (Wei y col. 2011). Según estos resultados, la interacción de VP5 con VDAC2 promovería la apoptosis y restringiría la replicación viral, mientras que su interacción con la subunidad p85 α de PI3K suprimiría la apoptosis prematura y aumentaría la producción viral. En cuanto a la proteína VP2, se ha observado que su expresión en células de mamífero o aviares provoca una fuerte inhibición en la síntesis de proteínas seguida de un proceso de muerte celular programada (Fernández-Arias y col. 1997). Esta observación contrasta con otros estudios del laboratorio en los que la expresión del gen completo de la poliproteína de IBDV, que incluye la región codificante de VP2, da lugar a la acumulación de productos derivados de la poliproteína así como al ensamblaje de pseudopartículas virales (VLPs) en ausencia de una respuesta apoptótica detectable (Fernández-Arias y col. 1998). Al inicio de este estudio se desconocían los mecanismos moleculares responsables de la respuesta diferencial provocada por la acumulación de la proteína VP2 tras su expresión en los dos contextos descritos.

1.2.2. Mecanismos de defensa viral frente a los efectos de la producción de interferón

Como se ha descrito anteriormente, además de las proteínas virales, el genoma dsRNA de algunos virus como IBDV, es un potente activador de diferentes rutas de señalización que dan lugar a la muerte celular programada. La célula contiene sensores que detectan moléculas dsRNA, completamente extrañas en el metabolismo de la célula eucariota, y que alertan a la célula frente a la infección viral (Jacobs y Langland 1996). Esta señalización induce la expresión y secreción de interferón a las células vecinas constituyendo una importante línea de defensa contra la infección viral en las células de mamíferos (Sadler y Williams 2008).

La producción de interferón induce la expresión de varios enzimas siendo las mejor caracterizadas las proteínas 2'-5'-oligoadenilato sintetasa (2'-5'-OAS) y la proteína quinasa dependiente de dsRNA (PKR) (Pestka y col. 1987; Sen y Lengyel 1992). El enzima 2'5'OAS polimeriza oligoadenilatos con enlace 2',5' (Kerr y Brown 1978) que activan el enzima RNasa L, que degrada moléculas de RNA de cadena sencilla (ssRNAs), como mRNAs, RNAs ribosómicos (rRNAs) o RNAs genómicos de algunos virus (Baglioni

y col. 1979; Floyd-Smith y col. 1981). La proteína quinasa PKR activada fosforila la subunidad α del factor de iniciación traduccional, eIF2, así como el inhibidor del factor de transcripción NF- κ B, I κ B. La fosforilación de eIF2 α altera la función de este factor y da lugar al bloqueo de la síntesis proteica (Farrel y col. 1977). La fosforilación de I κ B provoca su disociación de NF κ B, permitiendo a este factor de transcripción migrar al núcleo y estimular la transcripción de una gran variedad de genes (Kumar y col. 1994). La activación de 2'-5'OAS y PKR da como resultado la inhibición de la síntesis tanto de proteínas virales como del hospedador, la degradación de rRNAs y la activación de distintos factores de transcripción que amplifican la señal proapoptótica.

Algunos virus son resistentes a los efectos del interferón y pueden superar las defensas celulares inducidas por éste. Así, el virus de la gripe inhibe la activación de PKR activando la proteína celular P58 (Lee y col. 1990); el RNA VAI de adenovirus se une a PKR, impidiendo la unión de ésta al dsRNA (Mathews y Shenk 1991); el virus VACV codifica las proteínas E3 y K3 que previenen la activación de PKR de dos maneras: E3 secuestra el dsRNA y lo hace indetectable (Chang y col. 1992), mientras que la proteína K3, homologa a eIF2 α , actúa como inhibidor competitivo de la fosforilación de eIF2 α (Beattie y col. 1991). Otros virus, incluyendo los reovirus y los rotavirus, expresan proteínas como σ 3 (Huisman y Joklik 1976) o p8 (Langland y col. 1994), respectivamente, que se unen y sequestran el dsRNA de forma similar a E3.

1.2.3. Mecanismos de defensa viral frente al silenciamiento de RNA

El término silenciamiento de RNA engloba diversas vías de regulación de la expresión génica que controlan un gran número de procesos celulares, tales como eventos del desarrollo, la respuesta a distintos tipos de estrés o el mantenimiento de la estabilidad genómica, y agrupa una variedad de fenómenos conservados en animales, plantas, hongos y algunas protistas en los que moléculas cortas de RNA dan lugar a la represión de secuencias homólogas (Novina y Sharp 2004; Cerutti y Casas-Mollano 2006).

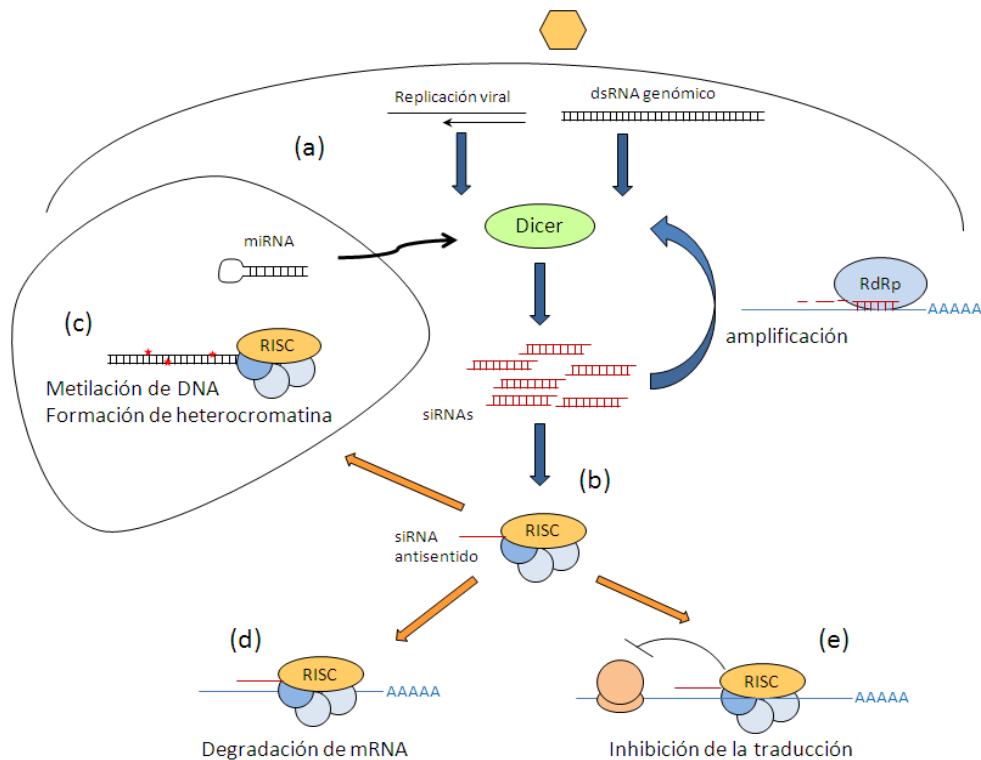


Figura 3. Mecanismos de silenciamiento génico. (a) Moléculas de dsRNA genómico viral, intermediarios de replicación viral o miRNAs con secuencias autocomplementarias en forma de horquilla son reconocidas por Dicer (en verde) y procesadas para generar siRNAs. (b) Los siRNAs son reconocidos por RISC que emplea la cadena antisentido de estos siRNAs para reconocer secuencias total o parcialmente complementarias e inducir el silenciamiento: (c) provocando la metilación del DNA y la formación de heterocromatina; (d) induciendo la degradación del mRNA diana o; (e) inhibiendo la traducción. La RdRp (en azul) amplifica la señal sintetizando la cadena complementaria al mRNA diana, empleando la cadena antisentido de los siRNAs como iniciadores de la reacción y generando nuevas moléculas de dsRNA que darán lugar a siRNAs secundarios.

Las rutas de silenciamiento de RNA involucran pequeñas moléculas de dsRNA de 21-26 nucleótidos denominados RNA interferentes (*short interfering RNAs*, siRNAs) que presentan dos nucleótidos desapareados en los extremos 3'. Los siRNAs se producen a partir de moléculas más largas de dsRNA que son procesadas en el citoplasma celular por una RNasa de tipo III denominada Dicer (Ghildiyal y Zamore 2009). El origen del dsRNA puede ser viral, como los dsRNAs producidos durante los procesos de replicación (intermediarios de replicación) o dsRNAs genómicos, o de origen celular, denominados microRNAs (miRNAs), que presentan secuencias autocomplementarias y forman estructuras secundarias dsRNA en forma de horquilla reconocidas por Dicer (Carthew y Sontheimer 2009). Los miRNA, detectados en todos los organismos eucariotas, son empleados en la regulación génica durante el desarrollo

para controlar los elementos transponibles, la metilación del DNA o la formación de heterocromatina (Li y Ding 2006). Los siRNAs y miRNAs activan un complejo proteico denominado complejo de silenciamiento inducido por RNA (*RNA-induced silencing complex*, RISC) que es el ejecutor del silenciamiento de RNA para lo que emplea una de las cadenas de estos dúplex de RNA para reconocer RNAs mensajeros y destruirlos o inhibir su traducción (Hammond y col.2000; Tomari y Zamore 2005).

En plantas, hongos y nematodos, los siRNAs, además de promover la degradación de mRNAs diana, también son capaces de promover la formación de dsRNA *de novo* a partir de los mRNAs diana. En este proceso intervienen enzimas RdRps que sintetizan una cadena complementaria al RNA diana, empleando una de las cadenas de los siRNAs como iniciadores de la reacción. A partir de este dsRNA se genera un nuevo conjunto de siRNAs denominados siRNAs secundarios, que provocan la amplificación del silenciamiento génico (Ahluwalia 2002). La amplificación permite al organismo establecer procesos de silenciamiento incluso cuando la cantidad de dsRNA inicial es muy pequeña.

El silenciamiento génico actúa como defensa antiviral en plantas e insectos (Voinet 2005; Csorba y col. 2009). Para contrarrestar este mecanismo, los virus que infectan estos organismos codifican proteínas supresoras de silenciamiento (Diaz-Pendon y Ding 2008; Valli y col. 2009). Estas proteínas son de gran importancia en el ciclo viral y su eliminación provoca una fuerte inhibición de su capacidad replicativa (Qiu y col. 2002; Wang y col. 2006; Ziebell y col. 2007). A pesar de los estudios realizados durante los últimos años, se desconoce si el silenciamiento de RNA juega un papel relevante en la inmunidad innata de los vertebrados. Estudios recientes muestran que los virus de vertebrados codifican una gran variedad de proteínas que interfieren con la maquinaria de silenciamiento de RNA como la proteína NS1 del virus de la gripe (Delgadillo y col. 2004), las proteínas VP30, VP35 y VP40 del virus Ebola (Fabozzi y col. 2011), la proteína E3 de VACV (Li y col. 2004), la proteína Tat del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (Bennasser y col. 2005), las proteínas C y E2 del virus de la hepatitis C (Wang y col. 2006), y la proteína 7a del virus de síndrome respiratorio agudo severo (SARS) (Karjee y col. 2011), lo que sugiere una posible implicación del silenciamiento de RNA en la respuesta antiviral de los vertebrados.

En el presente trabajo se ha estudiado la posible implicación de la proteína VP3 de IBDV en la interacción con los mecanismos de defensa antiviral del hospedador. Se ha observado que es capaz de inhibir la apoptosis dependiente de PKR así como actuar como supresora de silenciamiento de RNA *in vivo*. Por otra parte, se ha determinado que estas funciones están estrechamente ligadas a la interacción de VP3 con el dsRNA.

2 OBJETIVOS

Al inicio del presente estudio se desconocían los mecanismos empleados por IBDV para evadir la respuesta innata antiviral del hospedador. Como portador de un genoma dsRNA, potencial desencadenante de la respuesta apoptótica, parecía posible que la proteína multifuncional de unión al dsRNA, VP3, jugara un papel central en el control de los mecanismos de defensa antiviral innata de la célula infectada.

El objetivo general de esta tesis es el estudio de la proteína VP3 de IBDV como posible moduladora de la respuesta innata antiviral del hospedador y la importancia de la interacción de ésta con el dsRNA para el desarrollo de dicha función. A este respecto, nos propusimos los siguientes objetivos concretos:

1. Analizar la posible función de la proteína VP3 en el control de la respuesta apoptótica.
2. Estudiar la posible función de VP3 como proteína supresora de silenciamiento génico.
3. Caracterizar la interacción VP3-dsRNA:
 - 3.1. Determinar las constantes cinéticas de la interacción.
 - 3.2. Localizar con precisión el motivo de interacción con el dsRNA.
 - 3.3. Caracterizar el efecto de la eliminación del motivo de unión al dsRNA sobre la inhibición de la respuesta antiviral del hospedador.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material Biológico

3.1.1. Células procariotas

La cepa *E. coli* DH5 α (Raleigh y col. 2002) se utilizó para la amplificación de plásmidos recombinantes. La cepa de *E. coli* DH10Bac (Luckow y col. 1993) se utilizó para la generación de bácmidos infectivos de baculovirus. Las plantas *N. benthamiana* fueron infiltradas con la cepa C58C1 de *A. tumefaciens* (Tinland y Hohn 1995).

3.1.2. Células eucariotas

Para la generación, amplificación y expresión de baculovirus recombinantes (rBV) se utilizó la línea celular *High Five*TM (H5) (BTI-TN-5B1-4) (*Invitrogen*) que es un clon de células aislado de *Trichoplusia ni* (oruga del repollo). Para la obtención, crecimiento y expresión de proteínas clonadas en virus vaccinia (VACV) recombinantes (rVVs), se utilizaron células BSC-40 (ATCC, CRL-2761) que son células epiteliales de riñón de *Cercopithecus aethiops* (mono verde africano), derivadas de la línea BSC-1 (ATCC, CCL-26). Para la amplificación de IBDV y la obtención de dsRNA genómico se utilizó la línea celular QM7 derivada de fibroblastos musculares de *Coturnix japonica* (codorniz japonesa) (Antin y Ordahl, 1991, ATCC, CRL-1962). Para la obtención y crecimiento de virus recombinantes a partir del virus VACV WR se utilizaron células DF-1, fibroblastos de embrión de pollo espontáneamente transformados (ATCC, CRL-12203). Los ensayos bioquímicos para determinar la inducción de apoptosis y las infecciones con los distintos VACV recombinantes se hicieron en células HeLa; células epiteliales de cáncer de cérvix humano (ATCC, CCL-2TM).

Las células H5 se cultivaron en medio TC-100 (*GIBCO*) suplementado con 10% de FCS, penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 μ g/ml), gentamicina (50 μ g/ml) y fungizona (1 μ g/ml). Los cultivos de células aviares DF-1 y QM7 así como de células de mamífero BSC40 y HeLa fueron cultivadas en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Dulbecco y Freeman 1959) suplementado con 10% de FCS, penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 μ g/ml), gentamicina (50 μ g/ml), fungizona (0.5 μ g/ml) y aminoácidos no esenciales.

3.1.3. Plantas

Los ensayos de agroinfiltración se realizaron en plantas *Nicotiana benthamiana*. Las plantas fueron cultivadas en un invernadero, mantenidas con 16 h de luz mediante iluminación suplementaria a una temperatura de 19-23° C.

3.1.4. Plásmidos

Para el desarrollo de este trabajo se emplearon los siguientes plásmidos:

- **pFastBacHTb.** Plásmido de la casa comercial Invitrogen, se utilizó para la generación de rBVs. El gen heterólogo se encuentra bajo el control del promotor de la poliedrina y posee sitios específicos para la transposición del gen recombinante en el bácmido. Además, incorpora una cola de histidinas (6xHis) y un brazo espaciador en el extremo amino terminal de la proteína recombinante.
- **pVOTE2.** Plásmido de expresión e inserción eucariota en el locus hemaglutinina (HA) de VACV (gen A56R), cedido por el Dr. Bernard Moss (NIH, Bethesda, EEUU). El gen de interés está bajo el control del promotor de la RNA polimerasa del fago T7 (Ward y col., 1995).
- **pJR101.** Plásmido de transferencia de VACV (Gherardi y col. 1999). El gen heterólogo se encuentra bajo el control transcripcional del promotor sintético temprano/tardío Pse/I de VACV y el gen de selección β -glucuronidasa (β -GUS) de *E.coli* controlado por el promotor temprano/tardío P7.5. El cassette de inserción está flanqueado por secuencias correspondientes al locus hemaglutinina (HA) de VACV (gen A56R).
- **pDONR-207 y pNTAPi.** Se utilizó la tecnología GATEWAY para la generación de plásmidos de expresión de las diferentes versiones de VP3 de IBDV así como las versiones VP3 de DXV e IPNV; y NS1 de Influenza en plantas. pDONR-207 (Invitrogen) se utilizó como vector donante, mientras que pNTAPi (cedido por Michael Fromm, Universidad de Nebraska) (Rohila y col. 2004) se utilizó como vector receptor.
- **pUC57.** Se utilizó como vector de clonación.

3.1.5. Virus

En el transcurso de este trabajo se emplearon los siguientes virus:

3.1.5.1. Baculovirus

Este virus fue generado mediante manipulación genética a partir de un aislado de campo del virus de la poliedrosis de *Autographa californica* (AcPHV). La generación de baculovirus recombinantes (rBV) se realizó a partir de la cepa BV FastBac (*Invitrogen*).

Se utilizaron los siguientes rBVs generados previamente:

rBV hVP3. Expresa la proteína VP3 de IBDV con una cola de histidinas fusionada a su extremo N-terminal (Kochan y col. 2003).

En el presente trabajo se generaron los siguientes rBVs:

Todos los baculovirus generados expresan distintos polipéptidos con una cola de histidinas fusionada en su extremo N-terminal.

rBV hVP3P1. Expresa la proteína VP3 con cuatro sustituciones aminoacídicas en la región electropositiva Patch1 (K99D, R102D, K105D y K106D).

rBV hVP3P2. Expresa la proteína VP3 con cuatro sustituciones aminoacídicas en la región electropositiva Patch2 (R159D, R168D, H198D y R200D).

rBV hVP3P1+2. Expresa la proteína VP3 con ocho sustituciones aminoacídicas correspondientes a las regiones Patch1 y Patch2 (K99D, R102D, K105D, K106D, R159D, R168D, H198D y R200D).

rBVs hVP3K99D, hVP3R102D, hVP3K105D, hVP3K106D, hVP3K99D/R102D, hVP3K99D/K105D, hVP3K99D/K106D, hVP3R102D/K105D, hVP3R102D/K106D, hVP3K105D/K106D. Expresan la proteína VP3 con sustituciones de uno o dos residuos de la región electropositiva Patch1.

rBV hVP3DXV. Expresa la proteína VP3 del virus X de *Drosophila* (DXV).

rBV hVP3IPNV. Expresa la proteína VP3 del virus de la necrosis pancreática (IPNV).

3.1.5.2. VACV

Para la generación de los VACV recombinantes (rVVs) VT7/VP3P1, VT7/VP3P2 y VT7/VP3P1+2 se utilizó como cepa parental el virus recombinante VT7LacOI (Ward y col., 1995) llamado VT7 a partir de ahora, cedido por el Dr. Bernard Moss (NIH, Bethesda, EEUU). Para la generación de los virus recombinantes con la delección del gen E3L se utilizó como cepa parental el VACV WR/ Δ E3L (Brandt y Jacobs 2001) cedido por el Dr. B. Jacobs (Arizona State University, Tempe, Arizona, EEUU) que proviene de la cepa Western Reserve (WR) (Kaplan 1989).

Se utilizaron los siguientes rVVs generados previamente:

rVV VT7/VP2. Expresa la proteína VP2 del virus IBDV tras inducción con IPTG (Fernández-Arias y col. 1997).

rVV VT7/VP3wt. Expresa la proteína VP3 del virus IBDV tras inducción con IPTG (Fernández-Arias y col. 1997).

rVV WR/ Δ E3L. Carece del gen E3L y no expresa la proteína E3 de VACV (Brandt y Jacobs 2001).

rVV WR/PKR-NP. Expresa una versión dominante negativa de la proteína PKR que contiene una sustitución puntual (K269R) que la hace catalíticamente inactiva (Lee y Esteban 1993).

En este trabajo se generaron los siguientes rVVs:

rVV VT7/VP3P1. Expresa la proteína VP3 del virus IBDV con cuatro residuos sustituidos en la región Patch1 (K99D, R102D, K105D y K106D).

rVV VT7/VP3P2. Expresa la proteína VP3 del virus IBDV con cuatro residuos sustituidos en la región Patch2 (R159D, R168D, H198D y R200D).

rVV VT7/VP3P1+2. Expresa la proteína VP3 del virus IBDV con ocho residuos sustituidos en las regiones Patch1 y Patch2 (K99D, R102D, K105D, K106D, R159D, R168D, H198D y R200D).

rVV WR/ Δ E3LVP3. VACV con el gen E3L delecionado. Expresa la proteína VP3 del virus IBDV.

3.1.5.3. IBDV

Para las infecciones con IBDV ha sido empleada la cepa *Soroa* (Lombardo y col. 1999). Esta cepa viral, perteneciente al serotipo I, fue aislada de un pollo infectado en la región de Soroa (Cuba) y adaptada a crecer en cultivos primarios de fibroblastos embrionarios de pollo (CEF). Posteriormente, la cepa fue adaptada a crecer en diferentes células de mamífero.

3.1.6. Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados en este estudio fueron sueros específicos policlonales de conejo para las proteínas VP2 y VP3 de IBDV (Fernández-Arias y col. 1998), D13 de VACV (Heljasvaara y col. 2001), pT451 PKR (*Invitrogen*), eIF2 α total (*Santa Cruz Biotechnology*), pS52 eIF2 α (*Invitrogen*), CP de PPV (Mattanovich y col. 1989), y monoclonales de ratón específicos para la proteína E3 de VACV (cedido generosamente por B. Jacobs, Universidad del Estado de Arizona, Tempe, Arizona, EEUU), β -actina (*Sigma*), PKR total (*Santa Cruz Biotechnology*) y frente a la cola de histidinas (*Sigma*). Se utilizaron también anticuerpos conjugados IgG-Peroxidasa.

3.2. Obtención y manipulación de material biológico

3.2.1. PCR

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 50 μ l con 0.2 mM dNTPs, 200 ng de cada cebador, 2 ng de DNA molde, 20 mM TrisHCl pH 8.8, 10 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 10 mM (NH)₄SO₂, 0.1% Tritón X-100 y 2 U de DNA polimerasa *Vent* (*New England Biolabs*). El protocolo de amplificación fue el siguiente: 1 min a 94 °C; 30 ciclos de 40 seg a 92 °C, 40 seg a 60 °C y 1 min 30 seg a 75 °C; 5min a 75 °C.

3.2.2. Reacciones de ligación de fragmentos de DNA

Se realizaron en un volumen final de 20 μ l en un tampón 50 mM TrisHCl pH 7.8, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 25 μ g/ml BSA; utilizando 200 ng/ml de cada fragmento de DNA y 200 U de T4 DNA ligasa (*New England Biolabs*). Las reacciones se llevaron a cabo durante 16 h a 16 °C.

3.2.3. Reacciones de restricción enzimática

Se realizaron con enzimas procedentes de las casas comerciales *New England Biolabs* y *Fermentas*, según las indicaciones del proveedor.

3.2.4. Generación de plásmidos recombinantes

3.2.4.1. Generación de los plásmidos pFBHtb-VP3P1, pFBHtb-VP3P2 y pFBHtb-VP3P1+2

Un fragmento de DNA de 789 pb que contiene la versión mutante VP3MutPatch1 con cuatro sustituciones aminoacídicas en la región Patch1 (K99D, R102D, K105D y K106D), flanqueado por los sitios de restricción *Bam*HI y *Eco*RI, fue sintetizado *in vitro* (*Genscript*) e insertado en el sitio *Eco*RV localizado en el MCS del plásmido pUC57. Este plásmido se digirió con *Bam*HI y *Eco*RI y el fragmento resultante fue purificado e insertado en el MCS del vector de transferencia de baculovirus pFastBacHtb (*Invitrogen*), previamente digerido con las mismas enzimas de restricción. El plásmido que se obtuvo, pFastBacHtb-VP3P1, fue secuenciado para comprobar la corrección de su secuencia.

El plásmido pFastBacHtb-VP3P2 se generó de la misma manera que el anterior. En este caso, contiene la versión mutante VP3MutPatch2 con cuatro sustituciones aminoacídicas en la región Patch2 (R159D, R168D, H198D y R200D).

El plásmido pFastBacHtb-VP3P1+2 que contiene la versión mutante VP3MutPatch1+2 con ocho sustituciones puntuales, correspondientes a las regiones Patch1 y Patch2, fue generado sustituyendo el fragmento *Bam*HI/*Xba*I de la secuencia de VP3MutPatch2 por la correspondiente en la secuencia VP3MutPatch1. Esto fue posible porque existe un sitio único de restricción para *Xba*I en la secuencia entre Patch1 y Patch2.

3.2.4.2. Generación de los plásmidos pFastBacHtb-VP3K99D, -VP3R102D, -VP3K105D y -VP3K106D

Estos plásmidos se generaron por mutagénesis dirigida sobre el plásmido pFastBacHtb-VP3wt utilizando los cebadores enumerados en la Tabla 1 para obtener

secuencias de VP3 que tuvieran las mutaciones puntuales K99D, R102D, K105D y K106D.

3.2.4.3. Generación de los plásmidos pFastBacHtb-VP3K99D/R102D, -VP3K99D/K105D, -VP3K99D/K106D, -VP3R102D/K105D, -VP3R102D/K106D y -VP3K105D/K106D

Para generar los plásmidos con las versiones de VP3 con mutaciones dobles, se realizó mutagénesis dirigida sobre plásmidos pFastBacHtb-VP3 con diferentes mutaciones puntuales y utilizando los cebadores enumerados en la Tabla 1 para obtener secuencias de VP3 que tuvieran las mutaciones dobles indicadas.

Plásmido	Oligos (5'-3')	Molde
pFBHtbVP3K99D	GAAGCACAGAGGGAAGACGACACACGGATCTCA	pFBHtbVP3
pFBHtbVP3R102D	AGGGAAAAAGACACAGACATCTCAAAGAAGATG	pFBHtbVP3
pFBHtbVP3K105D	GACACACGGATCTCAGACAAGATGGAGACCATG	pFBHtbVP3
pFBHtbVP3K106D	ACACGGATCTCAAAGGACATGGAGACCATGGGC	pFBHtbVP3
pFBHtbVP3K99D/R102D	AGGGAAGACGACACAGACATCTCAAAGAAGATG	pFBHtbVP3K99D
pFBHtbVP3K99D/K105D	GACACACGGATCTCAGACAAGATGGAGACCATG	pFBHtbVP3K99D
pFBHtbVP3K99D/K106D	ACACGGATCTCAAAGGACATGGAGACCATGGGC	pFBHtbVP3K99D
pFBHtbVP3R102D/K105D	GACACAGACATCTCAGACAAGATGGAGACCATG	pFBHtbVP3R102D
pFBHtbVP3R102D/K106D	ACAGACATCTCAAAGGACATGGAGACCATGGGC	pFBHtbVP3R102D
pFBHtbVP3K105D/K106D	ACACGGATCTCAGACGACATGGAGACCATGGGC	pFBHtbVP3K105D

Tabla 1. Generación de plásmidos recombinantes con una o dos mutaciones puntuales. Se indica el plásmido generado, la secuencia de los oligonucleótidos empleados en la mutagénesis dirigida; y el plásmido empleado como molde para la PCR.

3.2.4.4. Generación de los plásmidos pFastBacHtb-VP3DXV y pFastBacHtb-VP3IPNV

Un fragmento de DNA de 856 bp que contiene la versión VP3DXV, flanqueado por los sitios de restricción *Bam*HI y *Eco*RI, fue sintetizado *in vitro* (*Genscript*) e insertado en el sitio *Eco*RV localizado en el MCS del plásmido pUC57. Este plásmido se digirió con *Bam*HI y *Eco*RI y el fragmento resultante fue purificado e insertado en el MCS del vector de transferencia de baculovirus pFastBacHtb (*Invitrogen*), previamente

digerido con las mismas enzimas de restricción. El plásmido que se obtuvo, pFastBacHtb-VP3DXV, fue secuenciado para comprobar la corrección de su secuencia.

Se siguió el mismo procedimiento para generar el plásmido pFastBacHtb-VP3IPNV que contiene el fragmento de DNA de 718 pb correspondiente a la versión VP3IPNV.

3.2.4.5. Generación de los plásmidos pVOTE-VP3P1, pVOTE-VP3P2 y pVOTE-VP3P1+2

El fragmento de DNA de 789 pb que contiene la región codificante de la versión mutante VP3Patch1, con cuatro sustituciones aminoacídicas (K99D, R102D, K105D y K106D), flanqueado por los sitios de restricción *NdeI* y *BamHI*, fue generado por PCR utilizando como molde el plásmido pFBHtb-VP3P1 previamente descrito y los oligos 5'-GCGCCATATGGCTGCATCAGAGTTCAAAGAG y 5'-GCGCGGATCCTCACTCAAGGTCCTCATCAGAG. El producto de la PCR resultante, fue purificado, digerido con *NdeI* y *BamHI* y ligado en el vector pVOTE2 previamente digerido con estas enzimas. El plásmido resultante, pVOTE/VP3P1, fue secuenciado para comprobar la corrección de la secuencia introducida.

Se siguió el mismo procedimiento para generar los plásmidos pVOTE/VP3P2 y pVOTE/VP3P1+2, esta vez utilizando como moldes los plásmidos pFBHtb-VP3P2 y pFBHtb-VP3P1+2 respectivamente.

3.2.4.6. Generación del plásmido pJR101-VP3

El fragmento de DNA de 789 pb que contiene la región codificante de la proteína VP3 flanqueado por los sitios de restricción *KpnI* y *BamHI*, fue obtenido por PCR utilizando como molde el plásmido pFBHtbVP3 (Kochan y col. 2003) y los oligos 5'-GCGCGGTACCATGGCTGCATCAGAGTTCAAAGAG y 5'-GCGCGGATCCTCACTCAAGGTCCTCATCAGAG. El fragmento de PCR resultante fue purificado, digerido con las enzimas *NdeI* y *BamHI* y ligado en el vector pJR101 previamente digerido con estas mismas enzimas. El plásmido resultante pJR101-VP3 fue secuenciado para comprobar la corrección de la secuencia introducida.

3.2.4.7. Generación de los plásmidos pNTAP-P1b, pNTAP-NS1, pNTAP-VP3, pNTAP-VP3Patch1, pNTAP-VP3Patch2, pNTAP-VP3Patch1+2, pNTAP-VP3DXV y pNTAP-VP3IPNV

Los vectores de expresión en plantas de las proteínas NS1 del virus de la gripe, VP3 de IBDV y sus versiones mutantes, así como VP3 de DXV y VP3 de IPNV, con una cola TAP fusionada en su extremo N-terminal, fueron generados por reacciones de LR clonasa entre el correspondiente vector donante pDONR y el vector receptor p35S-NTAP (Valli y col. 2012). Los plásmidos resultantes fueron secuenciados para comprobar la corrección de la secuencia introducida. Los plásmidos pDONR-P1b y p35S-NTAP-P1b habían sido generados previamente (Valli y col. 2008).

3.2.4.8. Generación del plásmido pICPPV-VP3

La región codificante correspondiente al polipéptido VP3 se clonó en un plásmido intermediario pGEMTp1p3 para generar pGEMTp1-VP3-p3. Este plásmido se empleó para reemplazar el fragmento equivalente en el cDNA genómico de una versión recombinante de PPV que contiene también la secuencia codificante de la proteína GFP para facilitar la monitorización de la infección (pICPPV-NK-GFPn), y se generó un cDNA infectivo denominado PPV-VP3 (Maliogka y col. 2012).

3.2.5. Obtención de Baculovirus recombinantes (rBV)

Los baculovirus recombinantes se generaron mediante el sistema denominado Bac-to-Bac (*Invitrogen*) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este método se basa en la transposición de los genes recombinantes en el genoma infectivo del baculovirus contenido en un vector (bácmido) propagado en la cepa de *E.coli* DH10Bac (Luckow y col. 1993). Una vez clonada la secuencia de interés en el plásmido donador (pFastBac), éste es empleado para transformar bacterias DH10Bac donde va a tener lugar la transposición del gen recombinante de expresión en el bácmido. Una vez seleccionados los bácmidos recombinantes, los rBV son generados mediante transfección de células H5 con dichos bácmidos. Finalmente, los rBV son amplificados mediante la infección de células H5 con el sobrenadante de las células transfectadas con los bácmidos.

3.2.6. Obtención de VACV recombinantes (rVVs)

Para la generación de rVVs, se infectaron células BSC-40 con el virus VT7/LacOI (VT7) a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,05 unidades formadoras de placa por célula (PFU/célula). Tras una hora, éstas células fueron transfectadas con plásmidos pVOTE con el gen de interés, utilizando lipofectamina 2000 (*Invitrogen*). Los plásmidos recombinan con el VT7 parental en secuencias de HA. A las 72h.p.i. los virus recombinantes son sometidos a tres rondas de selección mediante la adición de ácido micofenólico. Éste compuesto inhibe el enzima inosina monofosfato deshidrogenasa y provoca la depleción de nucleótidos púricos. Sólo los virus que hayan recombinado con el vector transfectado contendrán en su genoma el gen *gpt* de *E.coli* (fosforibosiltransferasa), que en presencia de xantina e hipoxantina permite producir nucleótidos púricos. Los rVVs fueron amplificados en células BSC-40.

3.2.7. Obtención del virus WR/ΔE3LVP3

Para la generación de este virus recombinante, se infectaron células DF-1 con el virus WR/ΔE3L a una MOI de 0,05 PFU/célula. Tras una hora, éstas células fueron transfectadas con el plásmido pJR101VP3, utilizando lipofectamina 2000 (*Invitrogen*). El plásmido recombina con el virus WR parental en secuencias de HA. Los clones del virus WR/ΔE3LVP3 se seleccionaron mediante la adición al medio de ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil β-D-glucopiranosido (X-gluc) y observando la aparición de placas azules debido a la presencia del gen de selección β-GUS en el vector de transferencia. Se realizaron tres rondas de selección y se crecieron y titularon en células DF-1. Posteriormente se utilizaron para infectar cultivos de células HeLa a 5 PFU/célula.

3.3. Infecciones y titulaciones virales

3.3.1. Infección con rBV

Cultivos confluentes de células H5 se infectaron a una MOI de 1-5 PFU/célula del rBV correspondiente en un volumen mínimo. Tras 1h de adsorción, se retiró el inóculo y se añadió medio TC-100 suplementado con 2% FCS.

3.3.2. Infección con rVV

Cultivos confluentes de células BSC40 y HeLa se infectaron a una MOI de 2 PFU/célula del rVV correspondiente en un volumen mínimo. Tras 1h de adsorción, se retiró el inóculo y se añadió medio DMEM suplementado con 2% FCS y 2mM IPTG.

3.3.3. Titulación de rVV

Los títulos virales se determinaron por ensayos de placa de lisis. Cultivos confluentes de células BSC40 se infectaron con altas diluciones virales. Tras 1 h de adsorción, se retiró el inóculo y se añadió medio DMEM suplementado con 2% FCS. A las 48 h.p.i. las células se fijaron con una solución de formaldehído al 10% durante 2 minutos a temperatura ambiente y se tiñeron con solución cristal violeta al 2%. Los títulos se determinaron por conteo de las placas de lisis.

3.3.4. Infección con IBDV

Para la purificación de viriones de IBDV, cultivos al 70-80% de confluencia de células QM7 se infectaron a una MOI de 1-2 PFU/cel en un volumen mínimo. Tras una hora de adsorción, se retiró el inóculo y se añadió medio DMEM suplementado con 2% FCS. A las 48-72 h.p.i., dependiendo del efecto citopático observado, se recogió el sobrenadante del cultivo. Para la producción de stock infeccioso de IBDV, se siguió el mismo procedimiento utilizando una MOI de 0.02-0.05 PFU/cel y se recogieron los sobrenadantes a las 72-96 h.p.i. dependiendo del efecto citopático observado.

3.3.5. Titulación de IBDV

Los títulos virales se determinaron por inmunotinción contra la proteína de la cápsida, VP2. Cultivos preconfluentes (50-60%) de células QM7 se infectaron con altas diluciones del virus. Tras 1 h de adsorción, el inóculo fue retirado y se añadió medio DMEM suplementado con 2% FCS. A las 72 h.p.i. las células se fijaron con metanol-acetona (1:1) durante 2 minutos a temperatura ambiente. Las células se incubaron con anticuerpo anti-VP2 durante 1 h 30 min y posteriormente se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa (*GE Healthcare*). Las placas de lisis se hacen visibles cuando se añade el sustrato $H_2O_2/3$, 3'-diaminobencidina (*Sigma*) en presencia de $NiSO_4$. Los títulos se determinaron por conteo de las placas de lisis.

3.4. Expresión y purificación de proteínas, viriones y ácidos nucleicos

3.4.1. Purificación de las proteínas con cola de histidinas

Las infecciones con los rBVs correspondientes se llevaron a cabo como se ha descrito en el apartado 3.3.1. A las 72 h.p.i. se rascaron las células y se retiró el sobrenadante por centrifugación a 1500 rpm 5 min y 4°C. La pastilla resultante se lavó con PBS frío y se volvió a centrifugar. La pastilla resultante se resuspendió en 1 ml de tampón de lisis 50mM TrisHCl, pH 8.0, 500mM NaCl y 0.1% Igepal CA-360 (*Sigma*), suplementado con inhibidores de proteasas (*Complete mini; Roche*) por cada placa p150 infectada. Las células se lisaron en hielo durante 30 min. Después, se centrifugaron a 11.000 rpm durante 15 min a 4°C. El sobrenadante obtenido se sometió a purificación mediante cromatografía de afinidad a metal (*IMAC*) empleando una resina unida a cobalto (*TALON Metal Affinity Resin, BD Biosciences-Clontech*) que tiene afinidad por la cola de histidinas. Las proteínas unidas a la resina se eluyeron con un tampón de elución (50 mM TrisHCl, pH 8.0, 500 mM NaCl y 250 mM imidazol). El eluido se dializó frente a 50 mM TrisHCl, pH 8.0 y 500 mM NaCl durante 16 h a 4°C para eliminar el imidazol.

3.4.2. Expresión de proteínas recombinantes en infecciones con rVVs

Cultivos de células HeLa infectados con los rVVs correspondientes fueron suplementados con 2 mM del inductor isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) durante los tiempos indicados en cada ensayo. Los genes que codifican la T7 RNA polimerasa y los elementos reguladores del operon lac de *Escherichia coli* están insertados en el genoma del VT7LacOI. El virus expresa constitutivamente el represor lac y la actividad de la T7 RNA polimerasa está bajo el control del operon lac insertado a continuación del promotor tardío de VACV. La expresión de las proteínas recombinantes ocurre al añadir al medio IPTG, compuesto análogo a la lactosa.

3.4.3. Purificación de viriones de IBDV

El sobrenadante de cultivos de células QM7 infectadas con IBDV fue mezclado en una relación 1:5 (v:v) con polietilenglicol 20% en 3M NaCl y fue incubado con agitación toda la noche a 4°C. Posteriormente, se centrifugó a 3,000 r.p.m. (1,000xg)

durante 30 min en un rotor basculante 5624 (*Hettich Zentrifugen*). El precipitado resultante fue resuspendido en PES (50 mM PIPES pH 6.2, 150 mM NaCl, 20 mM CaCl₂) suplementado con inhibidores de proteasas (*Complete Mini, Roche*) y nuevamente centrifugado a 3,000 r.p.m. (1,000xg) durante 30 min. El sobrenadante obtenido fue cargado en un colchón de sacarosa al 25 % en PES y ultracentrifugado a 37,000 r.p.m. (170,000xg) durante 2 h y 30 min en un rotor SW41 (*Beckman-Coulter Inc.*). El precipitado resultante fue resuspendido en PES y centrifugado en una microfuga 1 min a 13,000 r.p.m. (16,000xg). Todas las etapas de purificación fueron realizadas a 4°C.

3.4.4. Purificación de dsRNA de IBDV

El material de partida para la purificación de dsRNA viral fueron los viriones de IBDV obtenidos según se explica en el apartado 3.4.3. La muestra fue desnaturalizada en presencia de SDS al 1 % durante 3 min a 100°C y 1 min a 4°C. Posteriormente, fue digerida con proteinasa K a una concentración final de 2 mg/ml durante 1 h a 37°C. Finalmente, el dsRNA viral fue purificado mediante extracción con TriZol (*Invitrogen*) y adsorción en mini-columnas de gel de sílice (*Quiagen*), según las instrucciones de los fabricantes.

3.4.5. Agroinfiltración y detección de fluorescencia en plantas

Plantas *N. benthamiana* fueron infiltradas con la cepa C58C1 de *A. tumefaciens* conteniendo los plásmidos indicados en cada caso (Valli y col. 2006). La fluorescencia GFP fue monitorizada bajo un microscopio de fluorescencia Leica MZ FLIII con filtros de excitación y barrera de 480/40 y 510 nm, respectivamente. Las fotos de las hojas fueron tomadas con una cámara Olympus DP 70 y procesadas mediante el software DP Controller.

3.4.6. Extracción de proteínas y RNA de plantas infectadas

Las áreas de las hojas inoculadas que mostraban fluorescencia GFP fueron recogidas bajo luz UV. Las muestras control correspondientes a hojas no-infectadas fueron tomadas de áreas equivalentes. Para la preparación de las muestras proteicas, las hojas infiltradas fueron trituradas hasta obtener un polvo fino y se congelaron a -80°C con nitrógeno líquido. Los extractos proteicos se prepararon descongelando el

polvo en tampón de extracción (150 mM TrisHCl pH 7.6, 6 M urea, 2 % SDS y 5 % β -mercaptoetanol) (2 mg/ml). Las muestras se calentaron a 100°C durante 10 min, se centrifugaron a 18.000 x g durante 10 min a 4°C y se descartó la pastilla. El RNA total de las hojas agroinfiltradas se extrajo mediante el método de Lagrimini y col. (Lagrimini y col. 1990). Tras la precipitación con LiCl, la pastilla que contiene los mRNAs fue resuspendido en agua; y el sobrenadante que contiene los siRNAs fue precipitado con etanol y resuspendido en agua.

3.5. Análisis Bioquímico

3.5.1. Determinación de la activación de las caspasas 3 y 7

Las determinaciones se llevaron a cabo empleando el kit de ensayo Caspase-Glo 3/7 (*Promega*). Se cultivaron células HeLa en placas de 96 pocillos y se infectaron a las MOIs indicadas para cada ensayo. A los tiempos especificados post infección, se añadieron 100 μ l del reactivo Caspase-Glo 3/7 en cada pocillo. Las placas fueron incubadas en oscuridad a 20°C durante 1 h y se monitorizó la actividad luciferasa mediante un luminómetro Orion (Berthold technologies).

3.5.2. Marcaje metabólico con [³⁵S]-Met

Cultivos de células HeLa infectados con el virus de interés y a distintos tiempos post infección, se lavaron y se incubaron con medio de cultivo DMEM sin metionina durante 30 minutos. A continuación se añadió DMEM sin metionina suplementado con 2% FCS y una cantidad de marca de 50 μ Ci/ml. Tras 30 minutos a 37°C, se eliminó el medio, las monocapas se lavaron con PBS 1X y se recogieron en tampón Lemmli.

3.5.3. Ensayo de retardo de movilidad electroforética (EMSA)

Moléculas sintéticas ds-siRNA con 2-deoxinucleótidos desapareados en cada extremo 3' (5'CUUACGCUGAGUACUUCGATT3'/5'UCGAAGUACUCAGCGUAAGTT3') (*Sigma*) fueron radiactivamente marcadas con γ -³²P-ATP empleando el enzima T4 PNK (*Promega*). El dsRNA genómico de IBDV fue obtenido tal y como se explica en el apartado 3.4.4. Los siRNAs marcados (2 nM concentración final) o el dsRNA genómico de IBDV (7.5 nM concentración final) se incubaron con distintas cantidades de proteína

purificada. Las incubaciones se llevaron a cabo durante 30 min a temperatura ambiente en 20 µl de volumen final en un tampón 10 mM TrisHCl pH 8, 10 mM glicina, 2 mM DTT para las reacciones con siRNAs o en un tampón 50 mM TrisHCl pH 8, 150 mM NaCl y 0.5 µg/ml BSA para las reacciones con el dsRNA genómico de IBDV. Tras las incubaciones, los complejos proteína-siRNA se resolvieron en geles nativos de poliacrilamida al 5% y los complejos proteína-dsRNA se resolvieron en geles nativos de agarosa al 1%.

3.5.4. Análisis electroforético en geles desnaturalizantes de poliacrilamida

La resolución electroforética de las proteínas se llevó a cabo siguiendo el método de Laemmli de electroforesis en geles de SDS-Poliacrilamida (SDS-PAGE). Las muestras se mezclaron con tampón desnaturalizante 5X (62.5 mM TrisHCl pH 6.8, 1 % SDS, 0.06 % azul de bromofenol, 25 % glicerol y 10 mM DTT) y se cargaron en geles de poliacrilamida (37.5:1) al 10%. Estos geles fueron electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa, teñidos con una solución de azul de Coomassie al 2% en 10% metanol, 10% ácido acético o secados sobre papel 3MM (*Whatman*) y autorradiografiados.

3.5.5. Análisis electroforético en geles nativos de poliacrilamida

Para la resolución electroforética de los complejos siRNA-proteína en condiciones nativas, las muestras fueron mezcladas con un tampón 10 mM TrisHCl pH 8, 10 mM glicina, 2 mM DTT. Y cargadas en geles de poliacrilamida al 5 % en tampón 0.5X TBE (45 mM TrisHCl pH 8.0, 45 mM ácido bórico, 10 mM EDTA). Tras el proceso de electroforesis, los geles fueron secados sobre papel 3MM (*Whatman*) y autorradiografiados.

3.5.6. Análisis electroforético en geles nativos de agarosa

Para la resolución electroforética del dsRNA genómico y de los complejos dsRNA-proteína en condiciones nativas, las muestras fueron mezcladas con tampón de carga azul/naranja 6X de la casa comercial *Promega* (10 mM TrisHCl pH 7.5, 0.4 % naranja G, 0.03 % azul de bromofenol, 0.03 % xilencianol FF, 15 % Ficoll 400, 50 mM EDTA pH 8.0) y cargadas en geles de agarosa al 0.7 % en tampón TBE (90 mM TrisHCl pH 8.0, 90 mM ácido bórico, 20 mM EDTA). Tras el proceso de electroforesis, los geles

fueron teñidos durante 30 min en una solución de bromuro de etidio (BrEt) 0.5 µg/ml y lavados tres veces en agua durante 10 min.

3.5.7. Análisis por filtración en gel

Las proteínas purificadas por cromatografía de afinidad a metal (apartado 3.4.1.) fueron analizadas por filtración en gel mediante un sistema de cromatografía líquida (*ÄKTA FPLC, Pharmacia*) con una columna Superdex-200 5/15 (*Pharmacia*) previamente calibrada con catalasa (158 kDa), albúmina sérica (68 kDa), ovoalbúmina (50 kDa) y quimiotripsinógeno A (21 kDa). El equilibrado de la columna y la cromatografía se llevaron a cabo a una tasa de flujo de 0.5 ml/min a 4°C en un tampón 20 mM TrisHCl pH 7.5, 150 mM NaCl.

3.5.8. Electrotransferencia e inmunodetección (*Western Blot*)

Una vez llevada a cabo la separación electroforética mediante geles desnaturalizantes de poliacrilamida, éstos fueron electrotransferidos en condiciones semisecas durante 45 min a 200 mA a membranas de nitrocelulosa (*Protran, Schleicher & Schuell*) tras incubar durante 10 min tanto el gel como las membranas en tampón 48 mM Tris, 39 mM glicina, 0.0375 % (p/v), 20 % metanol (v/v). Las membranas fueron saturadas en solución de bloqueo (leche desnatada en polvo al 5% en tampón fosfato salino (PBS)) durante 30 min a temperatura ambiente y posteriormente incubadas con el correspondiente anticuerpo primario diluido (α -VP2 1:1000; α -VP3 1:1000; α -D13 1:1000; α -PKR 1:500; α -pT451 PKR 1:300; α -eIF2 α 1:1000; α -pS52 eIF2 α 1:500; α -E3 1:1000; α -CP 1:500; α -His 1:1000; α - β -actina 1:500) en solución de bloqueo durante 2 h a temperatura ambiente. Tras tres lavados de 10 min con PBS, se incubaron 2 h a temperatura ambiente con un anticuerpo de cabra α -IgG de conejo o de ratón conjugado a peroxidasa (*GE Healthcare*) diluido 1:5000 en solución de bloqueo. La membrana se lavó 3 veces con PBS durante 10 min y se reveló mediante la utilización del sistema comercial quimioluminiscente ECL (*GE Healthcare*) o mediante la adición de 4-cloro-1-naftol en presencia de 0.025 % de H₂O₂.

3.5.9. Detección de RNA mediante Northern Blot

Para el análisis mediante Northern blot del mRNA de la GFP, las muestras previamente extraídas (apartado 3.4.6.) fueron cargadas en geles de agarosa al 1.2 % con 6 % formaldehído y transferidas a membranas de nylon (*Zeta-Probe*) por capilaridad. Las membranas se prehibridaron con UltraHyb (*Ambion*) y se hibridaron con sondas DNA marcadas con [³²P] específicas para la secuencia codificante del gen GFP generados mediante el sistema Rediprime II (*Amersham*). Como control de carga, los geles fueron teñidos durante 30 min en una solución de BrEt 0.5 µg/ml y lavados tres veces en agua durante 10 min.

Para el análisis mediante Northern blot de los siRNAs derivados de la expresión del gen GFP, las muestras previamente extraídas (apartado 3.4.6.) fueron cargadas en geles de poliacrilamida al 15% con 7 M urea y transferidas en condiciones semisecas (*Bio-Rad*) a membranas de nylon (*Zeta-Probe*). Los siRNAs de la GFP fueron detectados mediante las ribosondas GF y P marcadas con [³²P] generadas por transcripción de la SP6 RNA polimerasa a partir de los vectores pGEMT-GF y pGEMT-P, respectivamente, linearizados tras digestión con SacII. Estos vectores contienen los nucleótidos de las posiciones 4-403 (GF) y 404-717 (P) del gen GFP clonados en pGEMT.

3.6. Análisis de la interacción de VP3-dsRNA mediante Resonancia de Plasmón de Superficie (SPR)

3.6.1. Preparación de los ligandos dsRNA

Las moléculas de RNA sin biotinar o biotiniladas en su extremo 5' fueron sintetizadas *in vitro* (*Biomers*). Las secuencias correspondientes a cada oligonucleótido empleado se indican en la Tabla 2. Los oligos de 24, 16 y 8 nt son perfectamente complementarios entre si y los oligos de 21, 19, 17, 15, 13, 11 y 9 nt son complementarios al oligo biotinilado de 24 nt desde su extremo 5'.

Para generar las moléculas dsRNA de 24, 16 y 8 nt, los oligos complementarios se hibridaron *in vitro* calentando las muestras a 100°C durante 1 min, enfriándolas posteriormente a temperatura ambiente durante 16 h. Estos dúplex de RNA biotinilado se emplearon posteriormente para tapizar las celdas del sensor chip.

Oligonucleótidos	Secuencia
24nt ssRNA (5'-3')	5'-Biotina-UCACUUACGCUGAGUACUUCGAGA
24nt ssRNA (3'-5')	5'UCUCGAAGUACUCAGCGUAAGUGA
16nt ssRNA (5'-3')	5'- Biotina-UCACUUACGCUGAGUA
16nt ssRNA (3'-5')	5'UACUCAGCGUAAGUGA
8nt ssRNA (5'-3')	5'- Biotina-UCACUUAC
8nt-ssRNA (3'-5')	5'GUAAGUGA
21nt-ssRNA (5'-3')	5'CGAAGUACUCAGCGUAAGUGA
19nt-ssRNA (5'-3')	5'AAGUACUCAGCGUAAGUGA
17nt-ssRNA (5'-3')	5'GUACUCAGCGUAAGUGA
15nt-ssRNA (5'-3')	5'ACUCAGCGUAAGUGA
13nt-ssRNA (5'-3')	5'UCAGCGUAAGUGA
11nt-ssRNA (5'-3')	5'AGCGUAAGUGA
9nt ssRNA (5'-3')	5'CGUAAGUGA

Tabla 2. Oligonucleótidos RNA empleados en el ensayo de SPR

3.6.2. Análisis mediante SPR

Todos los ensayos de SPR se llevaron a cabo en tampón de trabajo HBS-EP (10 mM Hepes pH 7.4, 200 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005 % surfactante P20) en un biosensor robotizado, modelo Biacore 3000 (*Biacore, GE Helthcare*). Se emplearon *sensor chips* SA, que contienen estreptavidina inmovilizada covalentemente al dextrano, donde se inmovilizaron los distintos oligos biotinilados.

Para el estudio de las constantes cinéticas y de afinidad en la formación del complejo VP3-dsRNA, se tapizaron tres celdas del *sensor chip* (FC2, FC3 y FC4) con moléculas dsRNA biotiniladas de 24, 16 y 8 nt que se inyectaron a una concentración variable entre 50-250 nM en tampón de trabajo, a una velocidad de flujo de 10 µl/min hasta alcanzar un nivel de captura de 260, 1600 y 780 unidades de resonancia (RU), respectivamente. Como superficie de referencia se empleó la FC1 vacía.

A continuación, se inyectaron diferentes concentraciones por duplicado de la proteína hVP3 (20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 y 0.131 nM) a un flujo de trabajo de 30 μ l/min, con un tiempo de asociación de 3 min y un tiempo de disociación de 4 min. Para regenerar la superficie del *sensor chip* se empleó NaCl 800 mM con un tiempo de contacto de 30 s. Los sensorgramas obtenidos correspondientes a las distintas concentraciones de proteína fueron superpuestos, alineados y analizados con el software BIAevaluation 4.1, ajustando los datos al modelo de interacción 1:1 de Langmuir e introduciendo una corrección para la deficiencia en el transporte de masas y considerando el analito VP3 como dímero. Todos los datos fueron procesados utilizando el método de doble referencia (Myszka 2000).

En el estudio de las versiones mutantes hVP3Patch1 y hVP3patch2, las proteínas se inyectaron a una velocidad de flujo de 30 μ l/min, a una concentración de 6 μ g/ml en tampón HBS-EP durante 2 min sobre una superficie, que previamente se había tapizado con 1000 RUs del dsRNA biotinilado de 24 nt. En el caso de las versiones de hVP3 con mutaciones puntuales y dobles se emplearon tres concentraciones distintas (50, 100 y 200 nM) de cada una de las proteínas. En este estudio el nivel de tapizado de la superficie del *sensor chip* con dsRNA biotinilado de 24 nt era de 50 RUs, y el tiempo de asociación fue de 1 min y el de disociación 2 min. Como control de estos experimentos, se inyectó la proteína hVP3wt a las mismas concentraciones y condiciones experimentales de cada ensayo.

Para determinar el tamaño mínimo de dsRNA capaz de formar el complejo con la proteína hVP3, se tapizó la superficie del *sensor chip* con aproximadamente 1000 RU de dsRNA de 24 nt. Posteriormente, se llevó a cabo la deshibridación del dúplex RNA biotinilado mediante la inyección de 1 M NaCl, 50 mM NaOH durante 1 min. A continuación, se inyectaron las moléculas de ssRNA de distintos tamaños (21, 19, 17, 15, 13, 11 y 9 nt) a una concentración de 500 nM con un tiempo de contacto de 2 min. Finalmente, la proteína hVP3 fue inyectada a una concentración de 20 nM durante 2 min. La señal obtenida por la unión de hVP3 a los dúplex RNA de distintas longitudes fue normalizada frente a las RUs obtenidas en la formación de cada dúplex RNA.

4 RESULTADOS

4.1. ESTUDIO DE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR LA EXPRESIÓN DE VP2 Y SU INHIBICIÓN POR VP3

4.1.1. La expresión de VP2 induce apoptosis a través de la fosforilación de PKR y eIF2 α

Estudios previos del laboratorio habían demostrado que la proteína de la cápsida del virus, VP2, es un potente inductor de apoptosis (Fernández-Arias y col. 1997). La expresión de versiones recombinantes de VP2 en diferentes sistemas celulares provoca una potente inhibición en la síntesis de proteínas celulares y degradación del RNA ribosómico (rRNA). Por otra parte, el análisis en diversas bases de datos no reveló la existencia de homología significativa entre la proteína VP2 y otros inductores de apoptosis. Al comienzo de este estudio, las bases moleculares responsables de la respuesta apoptótica provocada por la expresión de la proteína VP2 eran completamente desconocidas.

Para tratar de comprender los eventos moleculares desencadenados por la expresión de la proteína VP2, se utilizó un virus vacunal recombinante (VACV), VT7/VP2, previamente generado en el laboratorio (Fernández-Arias y col. 1997). VT7/VP2 expresa la proteína de la cápsida, VP2, en células mantenidas en presencia del inductor isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG). Se infectaron células HeLa tanto con el virus parental, VT7, utilizado para generar el VT7/VP2, así como con este último a una MOI de 2 PFU/célula y se mantuvieron en medio suplementado o no con 2 mM IPTG. A las 24 horas post infección (h.p.i.) los cultivos fueron empleados para analizar la respuesta apoptótica mediante el kit caspase-Glo 3/7 que determina el nivel de activación de las caspasas efectoras 3 y 7 mediante la valoración de la liberación del sustrato de la luciferasa debida a la actividad específica de ambas caspasas. Como control basal de actividad, se utilizaron células sin infectar y tratadas o no con el inductor IPTG.

Como se observa en la figura 4A, la infección con el virus parental, VT7, da lugar a una activación ligeramente superior a la observada en los cultivos no infectados. Sin embargo, en las células infectadas con el virus VT7/VP2 y tratadas con el inductor IPTG, la activación es 5 veces superior a la observada con el virus parental y en cultivos infectados con VT7/VP2 mantenidos en ausencia de IPTG, indicando que la expresión

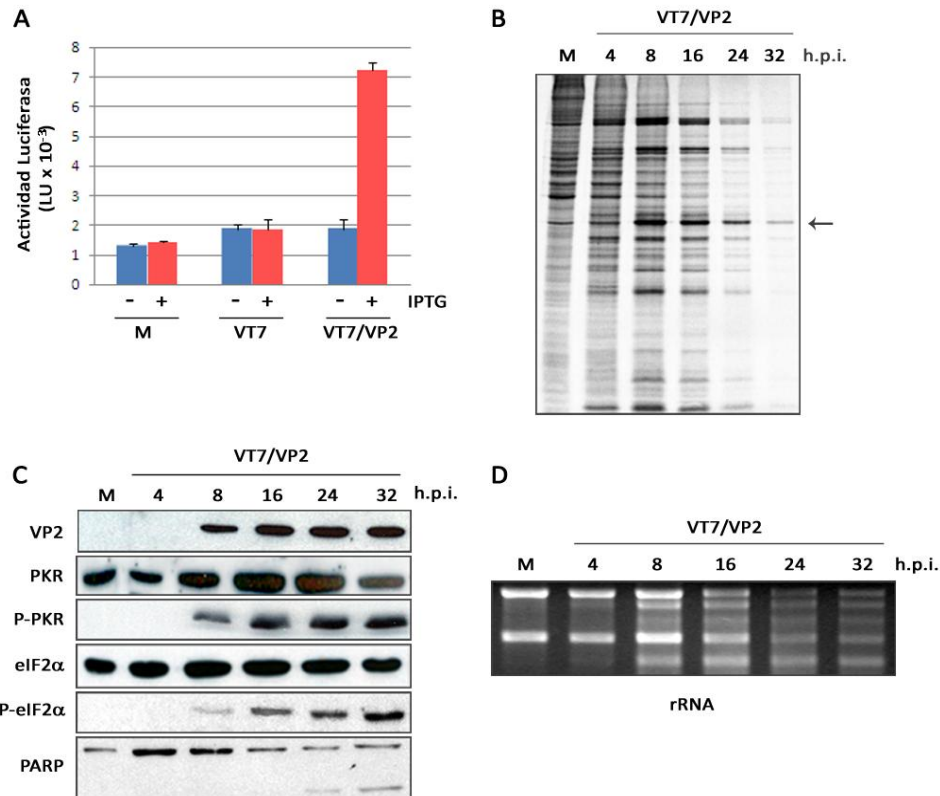


Figura 4. Caracterización de la repuesta celular desencadenada por la expresión de VP2 en células HeLa. A. Inducción de apoptosis. Cultivos de células HeLa sin infectar (M) o infectadas con VT7 o VT7/VP2 (2 PFU/célula de cada virus). Tras la infección, los cultivos se mantuvieron en ausencia (-) o en presencia (+) de 2 mM IPTG. La apoptosis se cuantificó utilizando el kit Caspase 3/7-Glo a las 24 h.p.i. Los datos presentados corresponden al promedio \pm DS de tres experimentos independientes. **B. Síntesis de proteínas celulares.** Autorradiografía correspondiente a un análisis cinético en células HeLa infectadas con VT7/VP2 y tratadas con IPTG. Cultivos de células sin infectar (M) se utilizaron como control. A los tiempos indicados (h.p.i.) las células se marcaron metabólicamente con [³⁵S]metionina durante 30 minutos y los extractos celulares se analizaron por SDS-PAGE y autorradiografía. La flecha indica la posición del polipéptido VP2. **C. Fosforilación de PKR y eIF2α.** A los tiempos indicados, se recogieron los extractos celulares correspondientes a cultivos sin infectar (M) o infectados con VT7/VP2 y se analizaron por SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se realizó un análisis Western Blot con sueros anti-VP2, -PKR, -pT451 PKR, -eIF2α, o -pS52 eIF2α. El WB correspondiente a eIF2α se utilizó como control de carga del experimento. **D. Degradación de rRNA.** A los tiempos indicados, se recogieron los extractos de células infectadas con VT7/VP2 y tratadas con IPTG. Se realizó la extracción del RNA mediante trizol/cloroformo y se analizó el estado de degradación del rRNA en geles de agarosa al 1% y teñidos con bromuro de etidio. El rRNA extraído de células sin infectar (M) se utilizó como control negativo.

de la proteína VP2 da lugar a una activación significativa de las caspasas efectoras 3 y 7, marcadoras de apoptosis. Esta activación fue posteriormente corroborada mediante análisis por WB empleando anticuerpos específicos frente la polimerasa poly (ADP-ribosa) (PARP), una proteína celular degradada por las mismas caspasas efectoras en células apoptóticas. La degradación de PARP es considerada como un marcador fiable de apoptosis (Duriez y Shah 1997). Como se muestra en la figura 4C, al analizar

mediante WB la degradación del factor PARP llevada a cabo por estas caspasas, se observa la aparición de una banda de menor tamaño a las 24 h.p.i.

A continuación, se realizaron dos tandas de experimentos con el fin de determinar el efecto de la expresión de VP2 en la síntesis de proteínas celulares y en el estado de degradación del rRNA. Cultivos de células HeLa se infectaron con el virus VT7/VP2 a una MOI de 2 PFU/célula y se mantuvieron en medio suplementado con 2 mM IPTG. Como control del experimento se utilizaron cultivos sin infectar y suplementados con 2 mM IPTG. El primer ensayo se empleó para determinar la síntesis proteica mediante una cinética de expresión. A distintos tiempos post infección, las células se incubaron en presencia de [³⁵S]metionina durante 30 minutos. Tras ese periodo los cultivos fueron recogidos y las muestras correspondientes sometidas a SDS-PAGE seguido de autorradiografía. Como se observa en la figura 4B, las células infectadas con VT7/VP2 en presencia de IPTG sufren una drástica reducción en la síntesis de proteínas a partir de las 16 h.p.i. Por otra parte, en estos cultivos se observó la aparición de alteraciones morfológicas características de la apoptosis tales como una intensa vacuolización del citoplasma, la fragmentación nuclear y la formación de cuerpos apoptóticos (datos no mostrados). Con el fin de analizar el estado de degradación del rRNA, las muestras se recogieron a los mismos tiempos post infección, se realizó la extracción del RNA total por fenol-cloroformo y las muestras se analizaron en geles de agarosa al 1% y teñidos con Bromuro de Etidio (BrEt). Este análisis nos permitió comprobar que las células infectadas sufren una marcada degradación del rRNA a partir de las 8 h.p.i. (Figura 4D). Estos datos indican la activación del módulo RNasaL/OAS que induce la degradación del rRNA como preludio a la muerte celular programada.

El análisis de estas muestras mediante WB mostró que la acumulación del polipéptido VP2 es detectable a las 8 h.p.i. y alcanza un máximo a las 16 h.p.i. (Figura 4C). Se analizó también el estado de fosforilación del factor eIF2 α , que se detecta a las 16 h.p.i. y que es un marcador característico de la inhibición de la síntesis proteica (Ernst y col. 1979). La fosforilación de este factor pueden llevarla a cabo cuatro quinasas conocidas que son activadas en respuesta a distintos tipos de estrés: PKR, quinasas de control general no desreprimible (*general control non-derepressible-2*;

GCN2), quinasa de retículo endoplasmático tipo PKR (*PKR-like endoplasmic reticulum kinase*; PERK) y el inhibidor regulado por grupos hemo (*haem-regulated inhibitor*; HRI). De éstas, PKR es la que más frecuentemente se encuentra activada en infecciones con distintos tipos de virus (Roberts y col. 2009). El análisis mediante WB mostró que mientras que los niveles de PKR y eIF2 α totales se mantienen prácticamente constantes a lo largo de la infección, la acumulación de las formas fosforiladas de ambas proteínas son detectables a partir de las 8 h.p.i. (Figura 4C), mostrando un perfil de expresión similar al del polipéptido VP2.

Estos resultados sugieren que la inducción de apoptosis provocada por la expresión del polipéptido de la cápsida, VP2, es probablemente debida a la activación de PKR y, en consecuencia, a la fosforilación y activación del factor eIF2 α .

4.1.2. La expresión de una versión dominante negativa de PKR, revierte la respuesta apoptótica inducida por VP2

Para comprobar que la inducción de apoptosis provocada por la expresión de VP2 se debe a la activación de PKR, se empleó un VACV recombinante previamente descrito que expresa una versión de recombinante de PKR que contiene una mutación puntual (K296R) que la hace catalíticamente inactiva. Este virus recombinante WR/PKR-NP se generó utilizando la cepa Western Reserve (WR) de VACV como virus parental (Lee y Esteban 1993). Se realizaron coinfecciones en células HeLa utilizando los virus VT7/VP2 + WR y VT7/VP2 + WR/PKR-NP a una MOI de 2 PFU/célula y se mantuvieron en ausencia o presencia de 2 mM IPTG durante 24h. Transcurrido este tiempo, los cultivos se emplearon para analizar la respuesta apoptótica inducida mediante el kit caspase-Glo 3/7 (Fig. 5A) y la degradación de PARP mediante WB (Fig. 5C).

La coinfección con el virus WR no provoca un aumento significativo en la activación de caspasas comparada con la observada en infecciones llevadas a cabo únicamente con VT7/VP2 (Fig. 1A). Sin embargo, en coinfecciones con el virus WR/PKR-NP observamos una reducción significativa en la activación de ambas caspasas. Estos resultados concuerdan con los datos recogidos del análisis del efecto de las diferentes infecciones sobre la síntesis proteica. Como se observa en la figura 2B, las células

coinfectadas con VT7/VP2 + WR muestran una drástica reducción en la incorporación de [³⁵S]metionina, mientras que en las células coinfectadas con VT7/VP2 + WR/PKR-NP la síntesis proteica es similar a la observada en las muestras sin inducir.

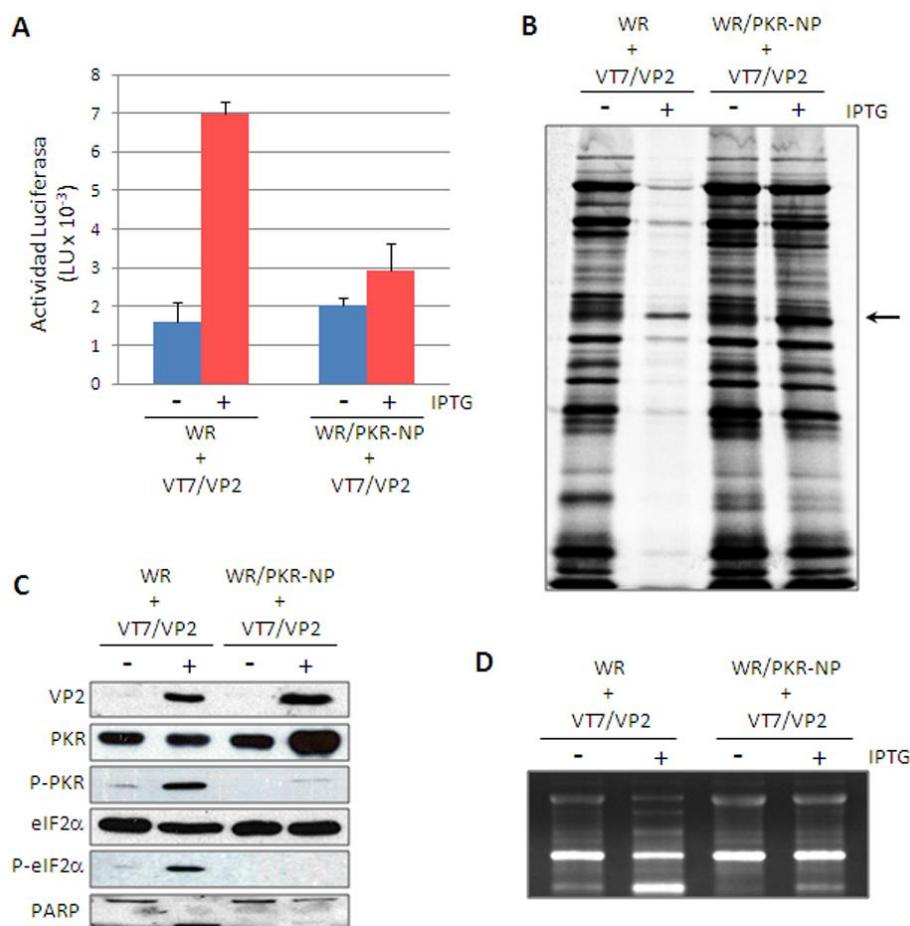


Figura 5. Efecto de la expresión de una forma dominante negativa de PKR (PKR-NP) sobre la respuesta celular inducida por la expresión de VP2. A. Inducción de apoptosis. Cultivos de células HeLa se coinfectaron con VT7/VP2 + WR o VT7/VP2 + WR/PKR-NP (2 PFU/célula de cada virus) y se mantuvieron en ausencia (-) o en presencia (+) de 2mM IPTG. La apoptosis se cuantificó mediante el kit Caspase-Glo 3/7 a las 24 h.p.i. Los datos corresponden a la media \pm DS de tres experimentos independientes. **B. Síntesis de proteínas celulares.** Autorradiografía correspondiente a la síntesis proteica de células coinfectadas con VT7/VP2 + WR o VT7/VP2 + WR/PKR-NP, mantenidas en ausencia (-) o en presencia (+) de 2mM del inductor IPTG. A las 24 h.p.i., las células se incubaron durante 30 minutos con [³⁵S]metionina y se sometieron a SDS-PAGE y autorradiografía. La flecha negra indica la banda correspondiente al polipéptido VP2. **C. Fosforilación de PKR y eIF2α.** Los extractos de células infectadas con VT7/VP2 + WR o VT7/VP2 + WR/PKR-NP, mantenidos en ausencia (-) o presencia (+) de 2mM IPTG, se recogieron a las 24 h.p.i., se sometieron a SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se incubaron con sueros anti-VP2, -PKR, -pT451 PKR, -eIF2α, o -pS52 eIF2α. El WB correspondiente a eIF2α se tomó como control de carga del experimento. **D. Degradación de rRNA.** Cultivos de células HeLa infectadas con VT7/VP2 + WR o VT7/VP2 + WR/PKR-NP mantenidas en ausencia (-) o en presencia (+) de 2mM IPTG, se recogieron a las 24 h.p.i. Se realizó la extracción del RNA mediante trizol/cloroformo y se analizó el estado de degradación del rRNA en geles de agarosa al 1% y teñidos con Bromuro de Etidio.

Por otra parte, se analizó la presencia de VP2, PKR y eIF2 α en estas muestras, así como la de las versiones fosforiladas de estas dos últimas proteínas, y también el estado de degradación del RNA ribosómico en las muestras procedentes de las diferentes infecciones. Constatamos la fosforilación de eIF2 α y PKR en células coinfectadas con VT7/VP2 + WR, lo que concuerda con la inhibición de síntesis proteica y la mayor degradación del RNA ribosómico observadas en estas muestras, mostradas en las figuras 5B y 5D respectivamente. No observamos fosforilación de ninguno de los dos polipéptidos en el caso de la coinfección con el virus WR/PKR-NP. Por otra parte, los niveles de expresión de VP2 son similares en ambos casos, así como los niveles totales de eIF2 α . Sin embargo, como era de esperar, observamos un aumento en los niveles totales de PKR en las coinfecciones con el virus WR/PKR-NP. Estos resultados claramente demuestran que la apoptosis inducida por la expresión del polipéptido VP2 implica la activación de PKR y la subsecuente fosforilación del factor eIF2 α .

4.1.3. La coexpresión de la proteína multifuncional VP3 previene la apoptosis inducida por la expresión de VP2

Los resultados descritos hasta el momento contrastaban con estudios previos del laboratorio donde en infecciones con el virus recombinante VT7/POLY, un VACV que expresa la poliproteína completa de IBDV, se obtenían pseudopartículas virales vacías (VLPs) prácticamente idénticas a los viriones IBDV, pero no se observaba inducción de apoptosis (Fernández-Arias y col. 1998). Esto nos indicaba que alguna de las proteínas producidas tras el procesamiento de la poliproteína era capaz de contrarrestar el efecto de VP2. Nuestra mejor candidata era la proteína VP3, ya que, al igual que otras proteínas virales capaces de inhibir la activación de PKR, como E3 de VACV (Chang y col. 1992), sigmaA del reovirus aviar (González-López y col. 2003) o NS1 del virus de la gripe (Tan y Katze 1998), es una proteína de unión al dsRNA (Kochan y col. 2003).

Para analizar si la expresión de VP3 era capaz de contrarrestar la respuesta apoptótica inducida por la expresión de VP2, se utilizó un VACV recombinante VT7/VP3 inducible por tratamiento con IPTG (Fernández-Arias y col. 1997). Cultivos de células HeLa se infectaron a una MOI 2 PFU/célula con el virus parental VT7, con VT7/VP2, o

con VT7/VP3 y se cultivaron en medio suplementado o no con 2mM IPTG. Así mismo, se realizaron coinfecciones con VT7 + VT7/VP2 y VT7/VP2 + VT7/VP3. A las 24 h.p.i. se analizó el estado de activación de las caspasas efectoras 3 y 7, el estado de la síntesis proteica, la degradación del rRNA y el grado de fosforilación de PKR y eIF2 α .

Tal y como se observa en la figura 3A, las células coinfectadas con VT7 + VT7/VP2 y tratadas con IPTG, muestran un nivel de activación de caspasas ligeramente inferior al observado en infecciones con el virus VT7/VP2 aunque marcadamente superior al del resto de muestras. La infección con el virus VT7/VP3 realizado en presencia de IPTG no da lugar a un aumento significativo en la actividad de las caspasas. Lo más interesante es que el nivel de activación de las caspasas en el caso de las células coinfectadas con VT7/VP2 + VT7/VP3 y tratadas con IPTG es similar al observado en las muestras de las células infectadas y sin inducir. El análisis mediante WB de la degradación del factor PARP confirmó estos resultados (Figura 6C).

Respecto al estado de la síntesis proteica en estas muestras, la figura 6B muestra que la inducción de IPTG de las células coinfectadas con VT7 + VT7/VP2 da lugar a una inhibición de síntesis proteica similar a la observada al infectar con el virus VT7/VP2. Sin embargo, las células coinfectadas con VT7/VP2 + VT7/VP3 tratadas con IPTG mostraron un nivel de síntesis proteica similar al observado en las infecciones con los virus VT7/VP3 y VT7. Al analizar el estado de degradación del rRNA, observamos que éste se encuentra intacto en las muestras correspondientes a coinfecciones VT7/VP2 + VT7/VP3, mientras que se observa una significativa degradación en las muestras que expresan sólo VP2 (Figura 6D). Como confirmación de estas observaciones, el análisis mediante WB revela la ausencia de fosforilación de PKR y eIF2 α en las muestras coinfectadas con VT7/VP2 + VT7/VP3 y tratadas con IPTG, mientras que es evidente en las muestras donde se expresa únicamente la proteína VP2. Los resultados obtenidos empleando este sistema de expresión, fueron corroborados coexpresando los polipéptidos VP2 y VP3 en ausencia de un contexto viral. Cultivos de células HeLa fueron transfectados con los vectores de expresión plasmídicos pcDNAVP2 y pcDNAVP3, derivados del vector de expresión eucariota pcDNA3. Como ya se había descrito previamente (Fernández-Arias y col. 1997), el efecto apoptótico asociado a la expresión de VP2 fue similar en estos experimentos y,

la coexpresión de VP3 previno eficientemente la activación de PKR y la activación de la cascada apoptótica también en este sistema (Busnadiego y col. 2012).

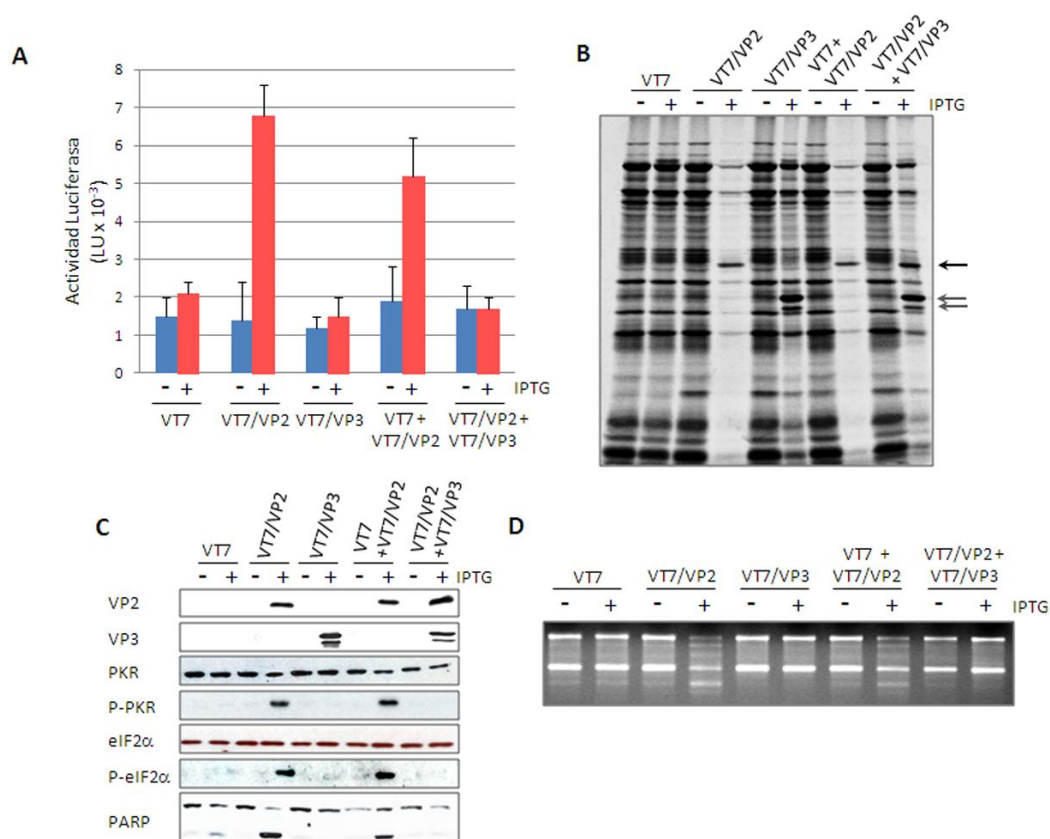


Figura 6. La expresión del polipéptido VP3 contrarresta las respuestas celulares inducidas por la expresión de VP2. **A. Inducción de apoptosis.** Cultivos de células HeLa infectadas con VT7, VT7/VP2 o VT7/VP3, o coinfectadas con VT7 + VT7/VP2 o VT7/VP2 + VT7/VP3 (2 PFU/célula para cada virus) se incubaron en ausencia (-) o en presencia (+) de 2mM IPTG. A las 24 h.p.i., la apoptosis fue cuantificada mediante el kit Caspase-Glo 3/7. Los datos se muestran como la media \pm DS de tres experimentos independientes. **B. Síntesis de proteínas celulares.** Autorradiografía correspondiente a la síntesis proteica de células infectadas con VT7, VT7/VP2 o VT7/VP3, o coinfectadas con VT7 + VT7/VP2 o VT7/VP2 + VT7/VP3 en presencia (+) o ausencia (-) de IPTG. A las 24 h.p.i. las células se incubaron durante 30min con [³⁵S]metionina y se analizaron por SDS-PAGE y autorradiografía. La flecha indica la banda correspondiente al polipéptido VP2 y las flechas grises corresponden a VP3. **C. Fosforilación de PKR y eIF2α.** Los extractos celulares infectados con VT7, VT7/VP2 o VT7/VP3, o coinfectados con VT7 + VT7/VP2 o VT7/VP2 + VT7/VP3 incubados en ausencia (-) o en presencia (+) de IPTG, se recogieron a las 24 h.p.i. Se sometieron a SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se incubaron con sueros anti-VP2, -PKR, -pT451 PKR, -eIF2α, o -pS52 eIF2α. El WB correspondiente a eIF2α se tomó como control de carga del experimento. **D. Degradación de rRNA.** A las 24 h.p.i., se extrajo el RNA total de células infectadas con VT7, VT7/VP2 o VT7/VP3, o coinfectadas con VT7 + VT7/VP2 o VT7/VP2 + VT7/VP3 e incubadas en ausencia (-) o en presencia (+) de 2mM IPTG mediante trizol/cloroformo. Se analizó el estado de degradación del rRNA en geles de agarosa al 1% y teñidos con Bromuro de Etidio.

En conclusión, estos resultados implican que la expresión de VP3 previene eficientemente la fosforilación de PKR y eIF2α y, por tanto, la respuesta apoptótica inducida por la expresión de VP2.

4.2. IMPLICACIÓN DEL MOTIVO DE UNIÓN A dsRNA DE VP3 EN LA INHIBICIÓN DE APOPTOSIS INDUCIDA POR VP2

4.2.1. Obtención de las versiones mutantes hVP3Patch1, hVP3Patch2 y hVP3Patch1+2

Se ha descrito que algunas proteínas virales de unión a dsRNA como, por ejemplo, la proteína E3 de VACV, requieren de su capacidad de unión al dsRNA para llevar a cabo sus funciones como inhibidoras de la respuesta innata del hospedador (Haga y col. 2005; Perdiguero y col. 2009). En el presente estudio, quisimos determinar si la interacción con el dsRNA era también esencial para el polipéptido VP3. Para ello, se requería el empleo de versiones mutantes de esta proteína incapaces de unir dsRNA. El análisis de la estructura cristalográfica de la región central del dímero VP3 (Casañas y col. 2008) permitió la localización de dos regiones marcadamente electropositivas en la superficie del mismo (Fig. 7). Estas regiones, denominadas Patch1 y Patch2 a partir de ahora, se localizan hacia la zona amino terminal y en la región central de cada monómero, respectivamente, y muestran una disposición simétrica en el dímero VP3. Los residuos básicos localizados en ambos dominios (Patch1: K99, R102, K105 y K106; Patch2: R159, R168, H198 y R200) presentan una elevada conservación en las cepas conocidas de IBDV y, por lo tanto, aparecían como excelentes candidatos para ser responsables de la interacción con el dsRNA. Para analizar esta posibilidad decidimos generar versiones mutantes de la proteína en los que los residuos básicos de ambos dominios fueron sustituidos por residuos de ácido aspártico (D), alterando de esta manera su carácter electrostático.

Se empleó el baculovirus recombinante rBVhVP3 previamente descrito, que expresa la proteína VP3 con una cola de His (HT) en el extremo N-terminal (Kochan y col. 2003), y se generaron nuevos rBVs que expresan las distintas formas mutantes de VP3 a analizar con el HT fusionado en sus extremos N-terminales. Se realizaron infecciones de células de insecto H5 con los rBVs correspondientes y los extractos se recogieron a las 72 h.p.i. Las proteínas hVP3Patch1 y hVP3Patch2, con las correspondientes sustituciones en cada monómero, y hVP3Patch1 + 2, con las dos regiones mutadas, se purificaron por cromatografía de afinidad a metal (*IMAC*). Se

comprobó la correcta expresión de estas proteínas por SDS-PAGE en geles al 12% y mediante WB con un suero policlonal anti-VP3 (Fig. 7B). Se observó una menor movilidad electroforética de los mutantes comparados con la proteína salvaje.

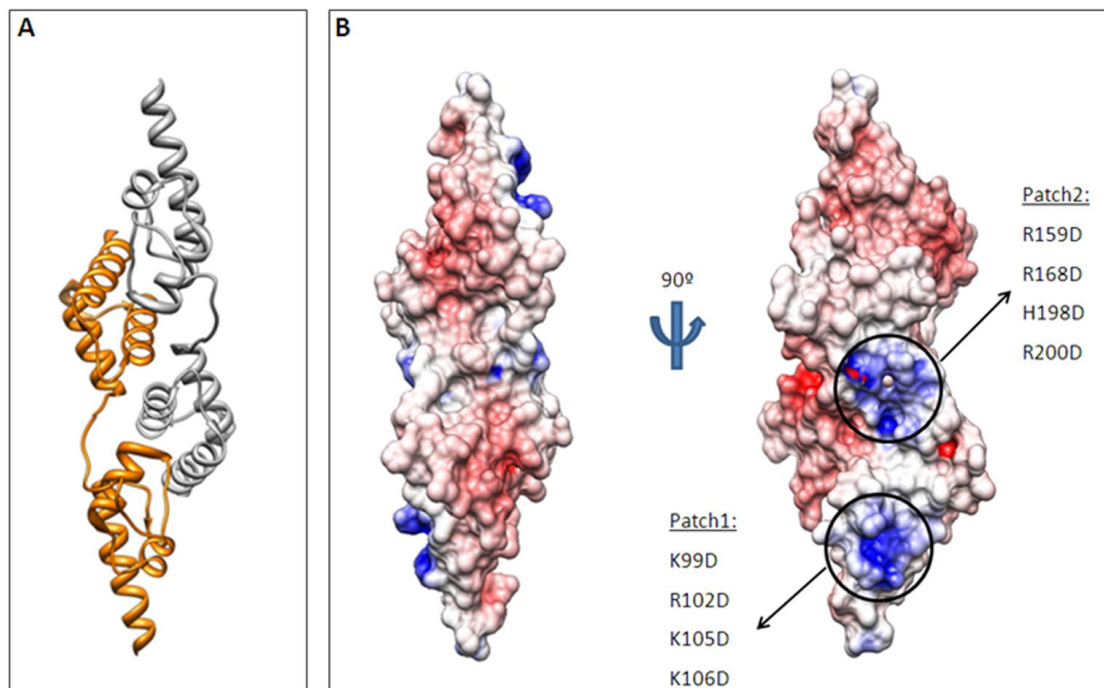


Figura 7. Dímero VP3. A. Estructura de la región central del polipéptido VP3. Diagrama donde se muestran los elementos de estructura secundaria. Cada monómero está indicado en un color (naranja y gris). B. Superficie del dímero coloreado según el potencial electrostático. Los círculos negros indican las superficies electrostáticas positivas correspondientes a Patch1 y Patch2.

Para comprobar que las mutaciones introducidas no provocan cambios estructurales significativos en el dímero, las distintas versiones de VP3 fueron purificadas y sometidas a filtración analítica en gel en una columna Superdex 200 5/150 GL previamente calibrada con marcadores proteicos de peso molecular conocido. Como se observa en la figura 8C, el perfil de elución de las versiones mutantes de VP3 es prácticamente idéntico al de la proteína salvaje VP3 indicando que las mutaciones introducidas no afectan a la capacidad de la proteína para formar dímeros, lo que sugiere que estas mutaciones no causan cambios drásticos en la estructura global de la proteína.

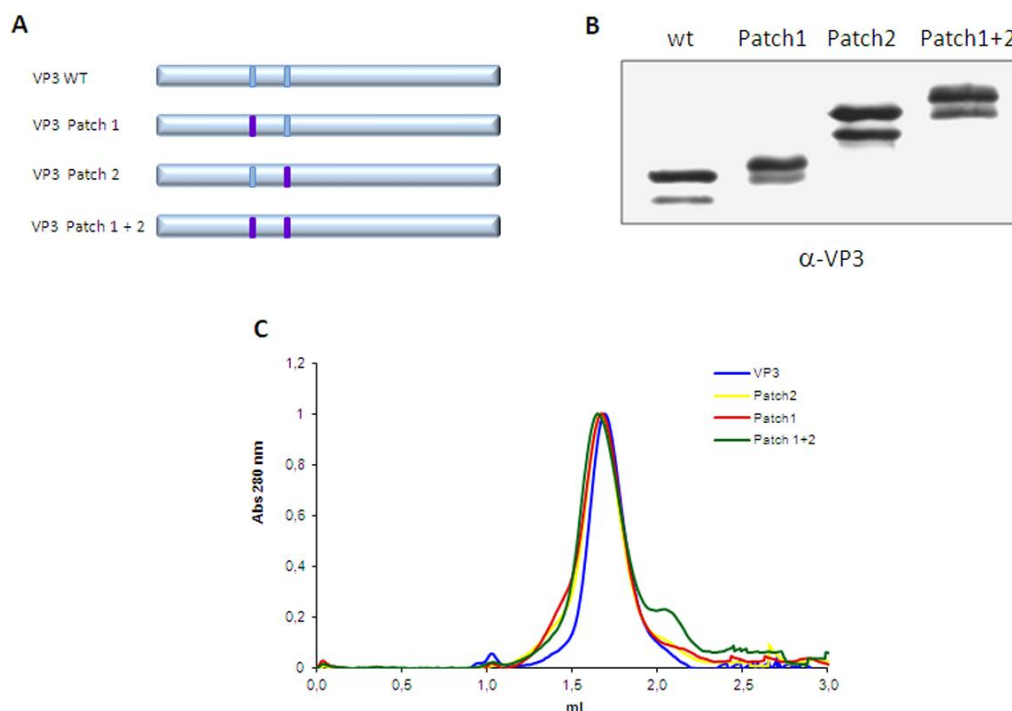


Figura 8. Versiones mutantes de VP3. **A.** Representación esquemática de los mutantes de VP3 generados en este estudio (las barras moradas indican las regiones mutadas). **B.** Análisis de expresión de las versiones mutantes de VP3. Cultivos de células H5 infectados con el rBV correspondiente se recogieron 72 h.p.i. y las proteínas recombinantes se purificaron mediante cromatografía de afinidad a metal. Se sometieron a SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se incubaron con suero anti-VP3. **C.** Análisis por gel-filtración analítica de la proteína VP3 de IBDV y sus versiones mutantes. La cromatografía se llevó a cabo en una columna Superdex 200 5/150 GL previamente calibrada con marcadores proteicos de conocido peso molecular y equilibrada con un tampón 20 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl a 4°C.

4.2.2. Análisis de la unión al dsRNA de las proteínas mutantes hVP3Patch1, hVP3Patch2 y hV3Patch1+2.

A continuación, se analizó la capacidad de estas versiones mutantes de VP3 de unir el dsRNA genómico de IBDV mediante ensayos de movilidad en gel (EMSA). Las proteínas recombinantes se obtuvieron de infecciones con los rBVs correspondientes y se purificaron por cromatografía de afinidad a metal. El dsRNA genómico de IBDV se obtuvo de infecciones de células aviares QM7 mediante purificación del virus por ultracentrifugación en un colchón de sacarosa al 25% y la posterior extracción del dsRNA por fenol-cloroformo. Diluciones seriadas de las versiones mutantes de la proteína VP3 se incubaron en presencia de una cantidad constante de dsRNA genómico viral. Posteriormente, las muestras fueron analizadas mediante electroforesis en geles de agarosa.

En la figura 9 observamos la movilidad correspondiente al dsRNA en la primera calle de cada gel. En el caso de la proteína nativa, se observa un retardo en la movilidad electroforética del dsRNA en todas las diluciones de la proteína. En el caso de hVP3Patch1, no se observa cambio en la movilidad del dsRNA lo que indica que la proteína no interacciona con el dsRNA a ninguna de las concentraciones de proteína testada. En el caso de hVP3Patch2, se observa un retardo en la movilidad del RNA en la muestra de concentración más elevada de proteína.

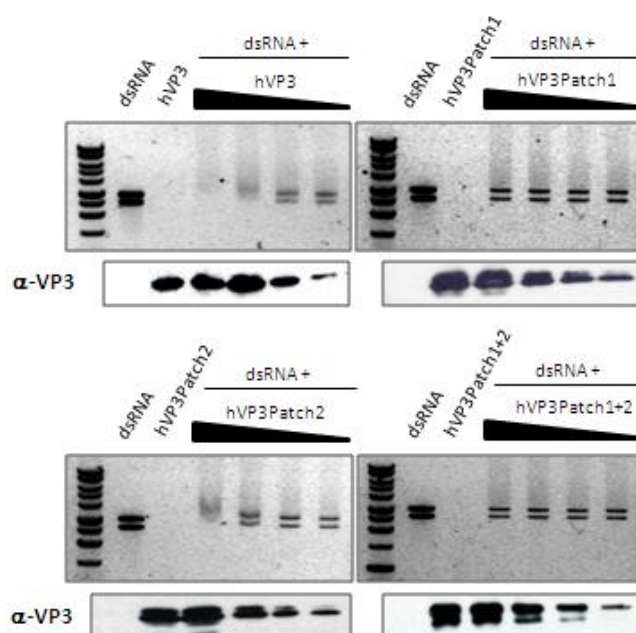


Figura 9. Ensayos de retardo de movilidad electroforética (EMSA) del dsRNA genómico de IBDV.

Las distintas versiones de hVP3 se expresaron en células de insecto (H5) y se purificaron por cromatografía de afinidad a metal. Se hicieron interaccionar con el dsRNA genómico de IBDV purificado de infecciones de células aviares QM7 y extraído mediante fenol/cloroformo. La interacción se llevó a cabo durante 30 minutos a temperatura ambiente utilizando distintas concentraciones de las proteínas (concentración final 80, 40, 20 y 10 nM) y 7,5 nM de dsRNA genómico. La movilidad electroforética del dsRNA se analizó en geles de agarosa 0,7% teñidos con Bromuro de Etidio. Estas mismas muestras se sometieron a SDS-PAGE, fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa y se incubaron con un suero anti-VP3.

Como era de esperar, tampoco se observa interacción con el dsRNA en el caso de la versión hVP3Patch1+2. Estos resultados, sugieren que ambas regiones, Patch1 y Patch2, están implicadas en la interacción con el dsRNA. Sin embargo, el cambio en el carácter electrostático de la región Patch1 elimina completamente la capacidad de unión al dsRNA, mientras que la mutación en la región Patch2 disminuye la actividad de unión. Estudios posteriores mostrados más adelante demuestran de forma precisa el papel de ambos dominios en la unión de la proteína al dsRNA.

4.2.3. Análisis de la capacidad de las versiones mutantes de prevenir la apoptosis inducida por la expresión de VP2

Una vez realizado el análisis descrito en el punto anterior, procedimos a determinar si la capacidad de unión al dsRNA, era requisito esencial para la función antiapoptótica de la proteína VP3. Para ello, se generaron mediante el método descrito previamente, los VACV recombinantes VT7/VP3P1, VT7/VP3P2 y VT7/VP3P1+2 que expresan las versiones mutantes VP3Patch1, VP3Patch2 y VP3Patch1+2 respectivamente. Estos virus fueron empleados para analizar su efecto en coinfecciones con el virus VT7/VP2 similares a los descritos en el apartado 4.1.3. Cultivos de células HeLa fueron coinfectados con éstos y con VT7/VP2. Se trataron con el inductor IPTG y a las 24h.p.i. se analizó el estado de fosforilación de las caspasas 3 y 7, el estado de la síntesis proteica, la degradación del rRNA y la fosforilación de PKR y eIF2 α (Figura 10).

La activación de las caspasas efectoras en las coinfecciones de VT7/VP2 + VT7/VP3P1 y VT7/VP2 + VT7/VP3P1+2 es muy similar a la observada en las muestras coinfectadas por VT7 + VT7/VP2. Sin embargo, en la coinfección con el mutante VT7/VP3P2 la activación de las caspasas efectoras es similar a la de los cultivos sin inducir (Figura 10A). En las muestras metabólicamente marcadas con [³⁵S]metionina se observa que el estado de síntesis proteica es similar en los carriles correspondientes a las coinfecciones de VT7/VP2 con VT7/VP3, VT7/VP3P2 y VT7 respectivamente (Figura 10B). Por lo tanto, las versiones de VP3 que mantienen su capacidad de unión al dsRNA, son capaces también de prevenir la apoptosis inducida por la expresión de VP2. Asimismo, la inhibición en la síntesis proteica es evidente en las coinfecciones de VT7/VP2 con VT7VP3P1 o VT7/VP3P1+2 donde los niveles son iguales a los observados en las coinfecciones de VT7 + VT7/VP2. Estos resultados se ven confirmados al observar el estado de degradación del rRNA (Figura 10D) así como el procesamiento de PARP y la fosforilación de PKR y del factor eIF2 α (Figura 10C).

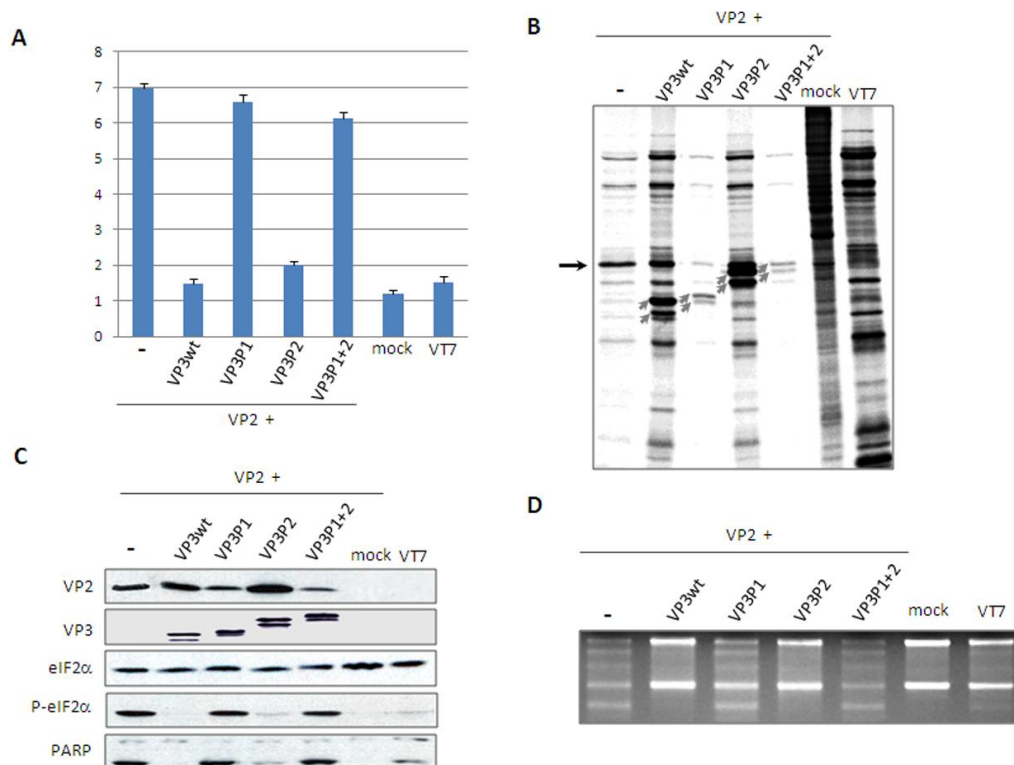


Figura 10. La eliminación del motivo de unión a dsRNA de VP3 anula su capacidad de prevenir las respuestas celulares desencadenadas por la expresión de VP2. **A. Inducción de apoptosis.** Cultivos de células HeLa se infectaron con VT7 o VT7/VP2 y se coinfectaron con VT7/VP3, VT7/VP3P1, VT7/VP3P2 o VT7/VP3P1+2 (2 PFU/célula para cada virus). Los cultivos se incubaron en presencia de 2mM IPTG. La inducción de apoptosis se cuantificó de los extractos celulares recogidos 24 h.p.i., mediante el kit Caspase-Glo 3/7. Se muestran los resultados como la media ± DS de tres experimentos independientes. **B. Síntesis de proteínas celulares.** Autorradiografía del perfil de síntesis proteica obtenido de células infectadas con VT7 o VT7/VP2 y coinfectadas con VT7/VP3, VT7/VP3P1, VT7/VP3P2 o VT7/VP3P1+2. Las células se incubaron con 2mM IPTG durante 24h. Transcurrido este tiempo, se incubaron durante 30 minutos en presencia de [³⁵S] metionina. Los extractos celulares se sometieron a SDS-PAGE y autorradiografía. Las flechas indican las posiciones correspondientes a VP2 (negra) y VP3 (gris). **C. Fosforilación de eIF2α.** Los extractos de células HeLa infectadas con VT7/VP2 o coinfectadas con los virus indicados y recogidos 24 h.p.i., fueron sometidos a SDS-PAGE, transferidos a membranas de nitrocelulosa e incubados con sueros anti-VP2, -VP3, -eIF2α, -pS52 eIF2α o -PARP. El WB anti-eIF2α fue tomado como control de carga del experimento. **D. Degradación del rRNA.** Se purificó el RNA total de extractos de células HeLa infectadas o coinfectadas con los virus indicados a las 24 h.p.i. El estado de degradación del rRNA se analizó en geles de agarosa al 1% teñidos con Bromuro de Etidio.

En conclusión, hemos observado que la capacidad de VP3 de unir el dsRNA es requisito imprescindible para contrarrestar la apoptosis inducida por la expresión de VP2, ya que las versiones mutantes VP3Patch1 y VP3Patch1+2, incapaces de unir el dsRNA, son también ineficaces a la hora de inhibir la apoptosis. Asimismo, la versión mutante VP3Patch2 que mantiene, aunque disminuida, su capacidad de unir el dsRNA, sigue siendo capaz de contrarrestar la apoptosis inducida por la expresión del polipéptido VP2.

4.3. ANÁLISIS DE HOMOLOGÍA FUNCIONAL DE VP3 CON LA PROTEÍNA E3 DE VACV

Debido a su actividad de unión al dsRNA y su efecto sobre la fosforilación de PKR, se sugirió la hipótesis de que VP3 podría ser funcionalmente homóloga a otras proteínas virales de unión a dsRNA responsables de la inhibición de la respuesta innata del hospedador, como son E3 de VACV (Chang y col. 1992) o NS1 del virus de la gripe (Tan y Katze 1998). Estudios previos han descrito que el virus WR/ Δ E3L, un mutante de delección derivado de la cepa Western Reserve (WR) de VACV, que carece del gen E3L y no expresa el polipéptido E3, es incapaz de replicar en líneas celulares con niveles basales de PKR e interferón como HeLa o BSC40 (Beattie y col. 1996). La inserción de genes recombinantes que codifican proteínas de unión a dsRNA de distintos virus, como NS1 del virus de la gripe (Guerra y col. 2011), sigmaA del reovirus aviar (González-López y col. 2003), y NSP3 del rotavirus porcino (Langland y col. 1994), en el genoma de WR/ Δ E3L, da lugar a virus VACV recombinantes capaces de superar la restricción impuesta por la carencia del gen E3L.

Para comprobar si la inserción de VP3 en el genoma del virus WR/ Δ E3L podía dar lugar a un virus capaz de replicar en células no permisivas, la región codificante correspondiente al gen VP3 se clonó en el vector de transferencia pJR101 bajo el control de un promotor sintético VACV temprano/tardío. El plásmido resultante, pJR101/VP3, fue empleado para generar el VACV recombinante WR/ Δ E3LVP3 por transfección de células DF1 previamente infectadas con WR/ Δ E3L. Las células DF1 son fibroblastos embrionarios de pollo inmortalizados donde el virus WR/ Δ E3L puede replicar de forma eficiente a pesar de carecer del polipéptido E3. El virus recombinante WR/ Δ E3LVP3, que expresa el polipéptido VP3 fue seleccionado, crecido y titulado en células DF1. A continuación, se infectaron cultivos de células HeLa con el virus WR/ Δ E3LVP3 a una MOI de 5 PFU/célula. Como control del experimento se infectaron estas mismas células con el virus parental WR y con el mutante de delección WR/ Δ E3L. A las 8 y 24 h.p.i., las células se marcaron metabólicamente con [35 S]metionina para analizar el estado de la síntesis proteica o se recogieron los extractos celulares para realizar un análisis mediante WB.

Tal y como se había descrito previamente (Chang y col. 1995), se observa una drástica inhibición de la síntesis proteica en las muestras infectadas con el virus defectivo WR/ Δ E3L desde las 8 h.p.i. y, en el análisis mediante WB llevado a cabo con un suero anti-actina, utilizado como control de carga, se observa que las muestras recogidas a las 24 h.p.i. carecen de cantidades detectables de proteína alguna. Por el contrario, las células infectadas con el virus WR o con WR/ Δ E3LVP3 se mantienen traduccionalmente activas a las 24 h.p.i. (Figura 11). En el análisis mediante WB llevado a cabo con sueros específicos para los polipéptidos E3 y VP3 se observa, como era de esperar, que el virus WR/ Δ E3LVP3 expresa la proteína VP3 pero carece de la proteína E3, confirmando así la identidad genética de este virus recombinante (Figura 11).

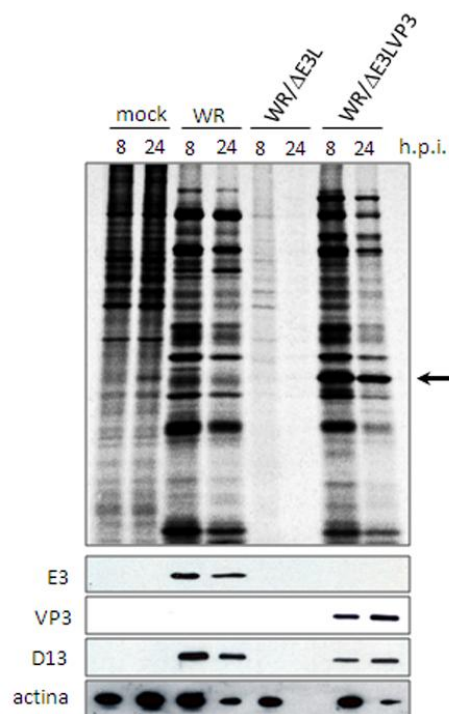


Figura 11. La expresión de VP3 restablece la capacidad del virus WR/ Δ E3L de crecer en cultivos de células HeLa. Cultivos de células HeLa se infectaron con los virus WR, WR/ Δ E3L o WR/ Δ E3LVP3 (5 PFU/célula para cada virus) A las 8 y 24 h.p.i., las células se incubaron con [35 S] metionina durante 30 minutos, se recogieron los extractos celulares y se sometieron a SDS-PAGE y autorradiografía. La flecha negra indica la posición del polipéptido VP3. Estos mismos extractos celulares, tras el SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se incubaron con sueros anti-E3, -VP3, -D13 y -actina. Este último se tomó como control de carga del experimento.

La detección mediante WB del polipéptido de expresión tardía, D13, de VACV en las muestras infectadas con el virus WR/ Δ E3LVP3 indica que este virus es capaz de completar un ciclo completo de replicación en células no permisivas para el virus parental WR/ Δ E3L. Estos resultados fueron posteriormente corroborados al observar que el virus WR/ Δ E3LVP3 ocasiona placas de lisis comparables a las del virus WR en cultivos de células HeLa, mientras que la infección con el virus WR/ Δ E3L no es capaz de inducir la formación de placas de lisis en esta línea celular (Fig. 12A).

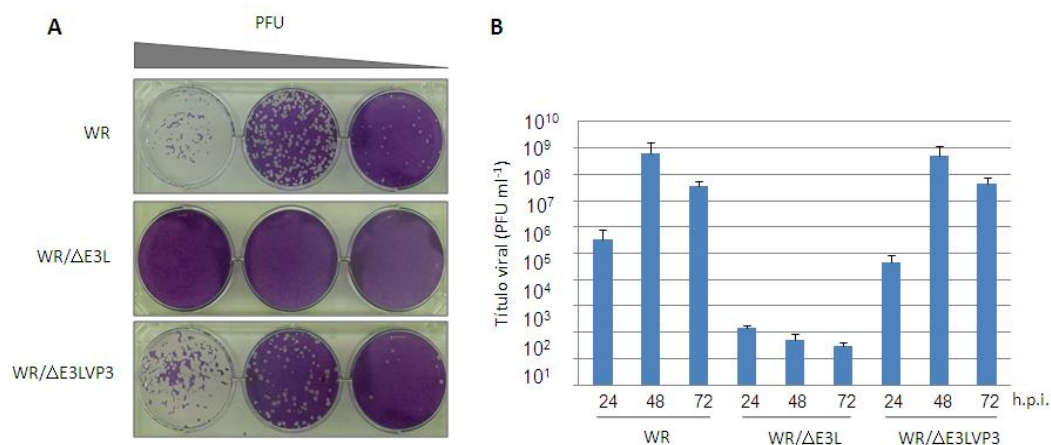


Figura 12. Replicación del virus recombinante WR/ΔE3LVP3 en células HeLa. A. Formación de placas. Cultivos de células HeLa fueron cultivadas en placas de 6 pocillos e infectadas con diluciones seriadas de los virus WR, WR/ΔE3L y WR/ΔE3LVP3. A las 48 h.p.i. se retiró el medio, las células se fijaron con formaldehído al 10% y se tiñeron con cristal violeta al 0,1% en etanol 20%. **B. Cinética de crecimiento.** Cultivos de células HeLa se infectaron con WR, WR/ΔE3L y WR/ΔE3LVP3 (0.1 PFU/célula para cada virus). A los tiempos indicados (h.p.i.) se recogieron los extractos celulares y se utilizaron para determinar el título viral en cultivos de células aviares DF-1.

Para analizar la capacidad de este virus recombinante WR/ΔE3LVP3 de replicar productivamente en células no permisivas, cultivos de células HeLa se infectaron a una MOI de 0.1 PFU/célula, se recogieron a las 24, 48 y 72 h.p.i. y se emplearon para determinar el título viral en células DF1. Como control del experimento, se realizaron infecciones y titulaciones con el virus WR y el mutante de delección WR/ΔE3L. Los resultados de este análisis se muestran en la figura 12B, y demuestran que, en contraste con el virus WR/ΔE3L, incapaz de crecer en células HeLa, el virus recombinante WR/ΔE3LVP3 es capaz de replicar de forma eficiente en estas células alcanzando títulos similares a los observados en células infectadas con el virus WR. Estos resultados demuestran que la proteína VP3 de IBDV restablece la capacidad del virus WR/ΔE3L de infectar de forma productiva cultivos de células HeLa.

4.4. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA VP3 COMO SUPRESORA DEL SILENCIAMIENTO GÉNICO

Por estudios previos del laboratorio se ha podido comprobar que el genoma dsRNA del virus IBDV se encuentra recubierto por moléculas de VP3 y unido en sus extremos 5' a la RNA-polimerasa RNA-dependiente (RdRp) del virus, VP1, formando complejos ribonucleoproteicos (RNPs) que protegen el genoma de la degradación por RNasa III *in vitro* (Luque y col. 2009). Los resultados descritos hasta el momento sugerían la posibilidad de que, al igual que las proteínas E3 de VACV o NS1 del virus de la gripe que actúan como moduladoras de la respuesta innata antiviral del hospedador y son capaces de antagonizar el silenciamiento génico (Li y col. 2004), VP3 podría también actuar como supresora de silenciamiento *in vivo*.

4.4.1. VP3 funciona como supresora de silenciamiento génico en un sistema heterólogo de plantas

Para analizar la posible actividad supresora de silenciamiento de VP3, utilizamos un sistema heterólogo de expresión transitoria en plantas *Nicotiana benthamiana* (Valli y col. 2009). Esta aproximación experimental nos permitiría observar el efecto de la expresión de VP3 sobre el silenciamiento de RNA en ausencia de otras rutas de señalización propias de los vertebrados tales como la respuesta inmune o la del interferón (Bridge y col. 2003; Sledz y col. 2003). Para ello, se empleó un plásmido de expresión pNTAPi en el que se clonó la región codificante de la proteína VP3 fusionada a una cola TAP N-terminal. El constructo resultante se transfirió a *Agrobacterium tumefaciens* para su uso posterior en ensayos de agroinfiltración. Como controles positivos del experimento se emplearon constructos equivalentes que expresan la proteína NS1 del virus de la gripe así como el supresor de silenciamiento P1b del virus del amarilleo del melón (CVYV) previamente descritos (Valli y col. 2008 y 2011). Como inductor, diana y reportero del silenciamiento de RNA se empleó un plásmido de expresión de la proteína verde fluorescente (GFP), p35S:GFP, previamente descrito (Valli y col. 2009). A partir de ahora, se hará referencia a las cepas de *Agrobacterium* por el plásmido que contienen: p35S:GFP, p35S-NTAP-VP3, p35S-NTAP-NS1 o p35S-NTAP-P1b.

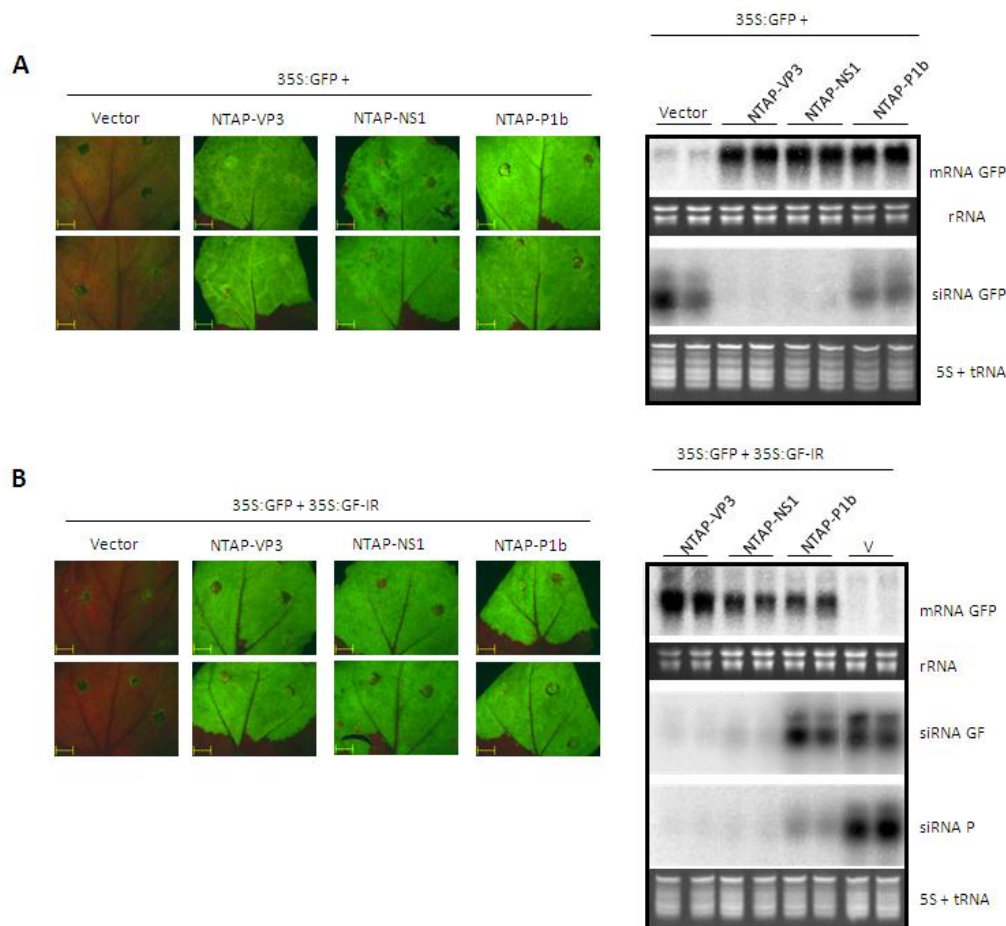


Figura 13. La proteína VP3 de IBDV suprime el silenciamiento de RNA inducido por ssRNA (A) e inducido por dsRNA (B) en plantas *N. benthamiana*. Se muestran imágenes de fluorescencia GFP tomadas bajo un microscopio de epifluorescencia utilizando los mismos tiempos de exposición (paneles izquierdos), y el análisis Northern blot de los mRNAs de la GFP y de los siRNAs derivados de la GFP (paneles derechos) en hojas infiltradas de dos plantas que expresan los constructos indicados y recogidas (6 d.p.a.). El RNA total fue aislado de las hojas infiltradas por el método de Lagrimini y col. (Lagrimini y col. 1990). Tras la precipitación con LiCl, la pastilla que contenía el mRNA se resuspendió en agua y el sobrenadante, que contenía los siRNAs fue precipitado con etanol y resuspendido en agua. Para el análisis Northern blot del mRNA de la GFP, las muestras se separaron en geles de agarosa al 1.2 % con 6% formaldehído y se transfirieron por capilaridad a una membrana de nylon. Para la detección de los mRNAs se emplearon sondas DNA marcadas con [³²P] específicas de la secuencia codificante GFP. Se utilizaron dos sondas distintas para la detección de los siRNAs de la GFP: la sonda GF (para siRNAs primarios y secundarios) corresponde al fragmento GFP incluido en la repetición invertida de RNA expresada en el plásmido p35S:GF:IR; y la sonda P (específica de siRNAs secundarios) corresponde a la región 3' terminal del gen GFP, que no se ha incluido en el p35S:GF-IR.

Las hojas infiltradas con las cepas p35S:GFP y pNTAPi vacío mostraron una alta intensidad de fluorescencia debida a la expresión de la proteína GFP, a los 2-3 días post agroinfiltración (d.p.a.) aunque la fluorescencia GFP de estas hojas disminuyó hasta niveles indetectables a los 6 d.p.a. debido a la activación del silenciamiento génico (Figura 13A). En consonancia con esta observación, el análisis mediante Northern blot

empleando una sonda antisentido correspondiente al mRNA de la GFP marcada con [³²P], reveló una baja acumulación de los mRNAs correspondientes al gen GFP (Figura 13B). Como era esperable, las hojas infiltradas con las cepas p35S:GFP y p35S-NTAP-NS1 o p35S-NTAP-P1b, que expresan las proteínas de fusión TAP-NS1 y TAP-P1b, respectivamente, muestran una gran intensidad de fluorescencia a los 6 d.p.a. y gran cantidad de mRNAs de GFP detectables mediante Northern blot. Este efecto resulta de la protección de estos mRNAs frente a la degradación por silenciamiento post-transcripcional mediado por ambas proteínas (Figura 13A). Finalmente, las hojas infiltradas con las cepas p35S:GFP y p35S-NTAP-VP3, que expresa la proteína de fusión TAP-VP3, muestran una intensidad de fluorescencia tan alta como la de los controles positivos a los 6 d.p.a. El análisis mediante Northern blot revela que la expresión de la proteína VP3 de IBDV provoca una inhibición de la degradación del transcrito de la GFP tan eficiente como la observada en hojas infiltradas con las cepas que expresan las proteínas NS1 y P1b (Figura 13A). De forma paralela, se realizaron experimentos similares con cepas de *Agrobacterium* que expresan las proteínas carentes de colas TAP y no se observaron cambios significativos ni en el nivel de expresión de GFP ni en la protección de su mRNA (datos no mostrados). Por lo tanto, los experimentos posteriores se realizaron empleando únicamente las cepas de expresión de las proteínas de fusión a TAP.

4.4.2. La expresión de la proteína VP3 reduce significativamente la generación de siRNAs primarios

Para inducir el silenciamiento de RNA a partir de la cepa p35S:GFP, el mRNA de GFP es primeramente convertido en dsRNA por una RNA-polimerasa RNA-dependiente del hospedador (Baulcombe 2006; García-Ruiz y col. 2010). Por lo tanto, con el fin de analizar de forma más precisa el mecanismo por el cual la proteína VP3 es capaz de suprimir el silenciamiento génico en este sistema, se generó una nueva cepa de *Agrobacterium* con una construcción que expresa una repetición invertida (IR) que produce dsRNA directamente a partir de la región 5' del gen GFP (p35S:GF-IR).

Las hojas infiltradas con las cepas p35S:GFP y p35S:GF-IR muestran una rápida y potente inducción de silenciamiento observable por la total ausencia de fluorescencia

GFP a los 6 d.p.a. y confirmada por el análisis mediante Northern blot donde no se observa presencia significativa de los mRNAs correspondientes al gen GFP (Figura 13B). Por el contrario, aquellas hojas que expresan NTAP-VP3 o los controles positivos NTAP-NS1 y NTAP-P1b, muestran una alta intensidad de fluorescencia GFP a los 6 d.p.a. corroborada en el análisis mediante Northern blot donde se aprecia la acumulación de mRNAs de la GFP (Figura 13B). Este resultado nos demuestra la capacidad de las diferentes proteínas analizadas para suprimir el silenciamiento génico también en este ensayo.

La acumulación de pequeñas moléculas de RNA interferente (siRNAs), generalmente dúplex de RNA de 21-24 nucleótidos producidos por el procesamiento de moléculas más largas de dsRNA por parte de Dicer, es el principal indicador de la inducción de silenciamiento génico (Xie y Qi 2008). Para determinar la presencia de los siRNAs de GFP, las muestras se analizaron mediante Northern blot empleando dos ribosondas distintas: la sonda GF corresponde al fragmento GFP incluido en la repetición invertida de RNA expresada por la cepa p35S:GF-IR; y la sonda P, que corresponde a la región 3' del gen GFP y no está codificada en el plásmido p35S:GF-IR. La sonda GF detecta los siRNAs primarios y secundarios producidos durante la degradación del mRNA de la GFP. Sin embargo, la sonda P detecta específicamente la acumulación de siRNAs secundarios generados en la fase de amplificación del silenciamiento génico.

La acumulación de los siRNAs de la GFP es observable en los análisis Northern blot de las hojas infiltradas con las cepas p35S:GFP o p35S:GFP y p35S:GF-IR junto con el vector vacío (Figuras 13A y B). En el experimento de silenciamiento inducido por la construcción p35S:GFP, la expresión del polipéptido TAP-P1b apenas tuvo efecto en la acumulación de siRNAs primarios ya que se ha descrito que actúa principalmente secuestrando estos siRNAs y evitando que sean reconocidos por el complejo efector del silenciamiento, RISC (Valli y col. 2008). Por el contrario, la expresión de las proteínas NTAP-NS1 y NTAP-VP3 impiden completamente la generación de estos siRNAs (Figura 13A). De forma similar, en el experimento de silenciamiento inducido por la infiltración de las cepas p35S:GFP y p35S:GF-IR, la expresión de NTAP-P1b no tuvo efecto alguno en la producción de siRNAs primarios (siRNA GF), que derivan

principalmente del estímulo con dsRNA (p35S:GF-IR). Sin embargo, la acumulación de siRNAs secundarios (siRNA P) que no son codificados por p35S:GF-IR sino que son generados de forma secundaria por una RdRp del hospedador en la fase de amplificación del proceso de silenciamiento, resulta fuertemente inhibida por NTAP-P1b (Figura 13B). Por el contrario, la expresión de las proteínas NTAP-NS1 y NTAP-VP3 provoca una inhibición prácticamente total de la producción tanto de los siRNAs secundarios derivados de la región P, como de aquellos siRNAs primarios derivados de la región GF (Figura 13B). Mientras que la proteína P1b suprime el silenciamiento de RNA secuestrando los siRNAs primarios e impidiendo su reconocimiento por el complejo RISC, estos resultados indican que las proteínas NS1 y VP3 emplean un mecanismo distinto para suprimir el silenciamiento impidiendo la acumulación de siRNAs.

4.4.3. Análisis de la unión a siRNAs de VP3

En el apartado anterior hemos demostrado que la expresión de la proteína VP3 permite la acumulación de los mRNAs de GFP e inhibe la producción de los siRNAs característicos de los procesos de silenciamiento. A continuación quisimos determinar si la proteína VP3 era capaz de interactuar con moléculas de siRNA. Se realizaron ensayos de movilidad en gel (EMSA) empleando moléculas sintéticas de siRNA de 21 y 26 nt con dos nucleótidos desapareados en cada extremo 3', análogos a los generados en los procesos de silenciamiento (Carthew y Sontheimer 2009). La secuencia elegida para estos siRNAs fue seleccionada mediante análisis *in silico* basándonos en la secuencia del gen GFP utilizada en los experimentos descritos en el apartado 4.1.1.

Concentraciones crecientes de la proteína hVP3 purificada de infecciones de células de insecto se incubaron con siRNAs de 21 o 26 nt marcados con [³²P] en sus extremos 5' durante 30 min a Tª ambiente. Los complejos hVP3-siRNA se analizaron mediante electroforesis en geles nativos de poliacrilamida al 7% y posterior revelado por autorradiografía. Como control positivo, se empleó la proteína P1b previamente descrita (Figura 14). Estos resultados demuestran que la proteína VP3 interactúa eficientemente con los siRNAs de ambas longitudes. Ya que observamos un claro retardo de los siRNAs en ambos ensayos.

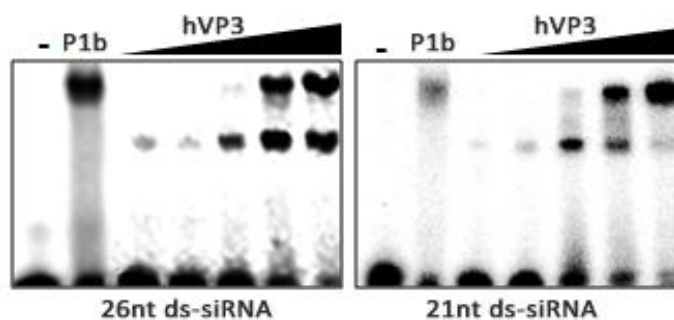


Figura 14. Ensayos de retardo de movilidad en gel (EMSA) de siRNAs de 21nt y 26nt marcados con [32 P]. La proteína hVP3 se purificó por columna de afinidad de infecciones en células de insecto (H5) con el rBV correspondiente. La interacción se llevó a cabo en un tampón 10 mM Tris HCl pH 8, 10 mM glicina y 2 mM DTT durante 30 minutos a temperatura ambiente utilizando concentraciones crecientes de proteína (concentración final: 80, 160, 320, 640 y 1200 nM) y 2nM de cada siRNA. La movilidad electroforética de los siRNAs de 21nt y 26nt se resolvió en geles nativos de poliácridamida al 7% revelados por autorradiografía.

Es importante destacar la aparición de dos bandas que podrían corresponder a dos tipos de complejo hVP3-siRNA. La proteína P1b es una proteína de 40 kDa que forma homodímeros y se ha sugerido que podría formar también oligómeros en solución (Valli y col. 2008). Por lo tanto, la señal observada en el segundo carril de cada gel podría corresponder a un dímero de P1b (~80 kDa) o a un oligómero de mayor tamaño. La proteína VP3 forma dímeros en solución (~30 kDa) (Casañas y col. 2008) y por estudios previos del laboratorio sabemos que la proteína VP3 es capaz de formar también oligómeros (Maraver y col. 2003b). Por tanto, se ha propuesto la hipótesis de que VP3 podría estar interaccionando con los siRNAs como un dímero dando lugar a la banda de menor tamaño, o formando oligómeros obteniéndose así la banda superior.

4.4.4. El motivo de unión al dsRNA de VP3 es crucial para la supresión del silenciamiento génico

A continuación, quisimos determinar la importancia de la interacción VP3-dsRNA en la actividad supresora de silenciamiento de VP3. Para ello, se analizó la capacidad de interacción de las versiones mutantes hVP3Patch1, hVP3Patch2 y hVP3Patch1+2 descritas en el apartado 4.2.1 con moléculas siRNA mediante EMSA. Las versiones mutantes de VP3 con un HT en el extremo N-terminal se purificaron mediante cromatografía de afinidad a metal a partir de extractos celulares infectados con los rBVs correspondientes y se incubaron durante 30 min a Tª ambiente con

siRNAs de 21nt marcados con [32 P]. Los complejos se analizaron en geles nativos de poliacrilamida al 7% revelados por autorradiografía.

Los resultados recogidos en la figura 15 están en total concordancia con los observados en los experimentos realizados con el dsRNA genómico de IBDV (apartado 4.2.2. y figura 6). La proteína hVP3Patch2 provoca un ligero retardo en la movilidad de los siRNAs, aunque significativamente inferior al ocasionado por la proteína salvaje (Figura 14). Por el contrario, las versiones mutantes hVP3Patch1 y hVP3Patch1+2 no afectan a la movilidad de los siRNAs. Estos resultados indican que la región Patch1 es imprescindible para la interacción con los siRNAs en estos ensayos.

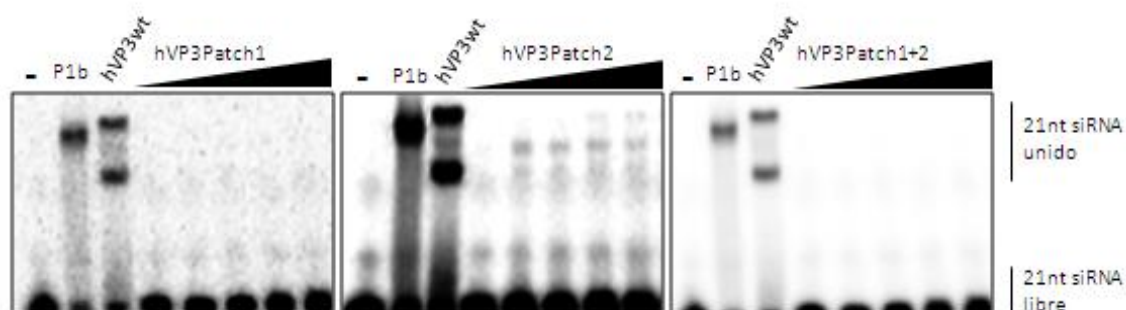


Figura 15. Ensayos de retardo de movilidad en gel (EMSA) de siRNAs de 21nt marcados con [32 P]. Las distintas versiones de hVP3 se purificaron por columna de afinidad de infecciones en células de insecto (H5) con los rBVs correspondientes. La interacción con los siRNAs de 21 nt se llevó a cabo en un tampón 10 mM Tris HCl pH 8, 10 mM glicina y 2 mM DTT durante 30 minutos a temperatura ambiente utilizando concentraciones crecientes de proteína (concentración final: 80, 160, 320, 640 y 1200 nM) y 2nM de siRNAs previamente marcados en cada extremo 5' con [32 P]. La movilidad electroforética del siRNA de 21nt se resolvió en geles nativos de poliacrilamida al 7% y revelados por autorradiografía.

Posteriormente, se analizó la actividad supresora de silenciamiento de las versiones mutantes de VP3. Las regiones codificantes de VP3Patch1, VP3Patch2 y VP3Patch1+2 se clonaron en vectores de expresión pNTAPi y se transfirieron a *A. tumefaciens* y se emplearon para infiltrar plantas *N. benthamiana* donde se indujo el silenciamiento génico por infiltración de las construcciones p35S:GFP y p35S:GF-IR. Los resultados indican que las hojas que expresan NTAP-VP3 y NTAP-VP3Patch2 así como el control positivo NTAP-P1b, muestran una alta intensidad de fluorescencia y una protección eficiente de los mRNAs de la GFP a los 6 d.p.a. (Figura 16). Por el contrario, en las hojas infiltradas con p35S:GFP y p35S:GF-IR que expresan NTAP-VP3Patch1 o

NTAP VP3Patch1+2, al igual que en las plantas control infiltradas con el vector vacío, no se detecta fluorescencia GFP ni acumulación de mRNAs de GFP.

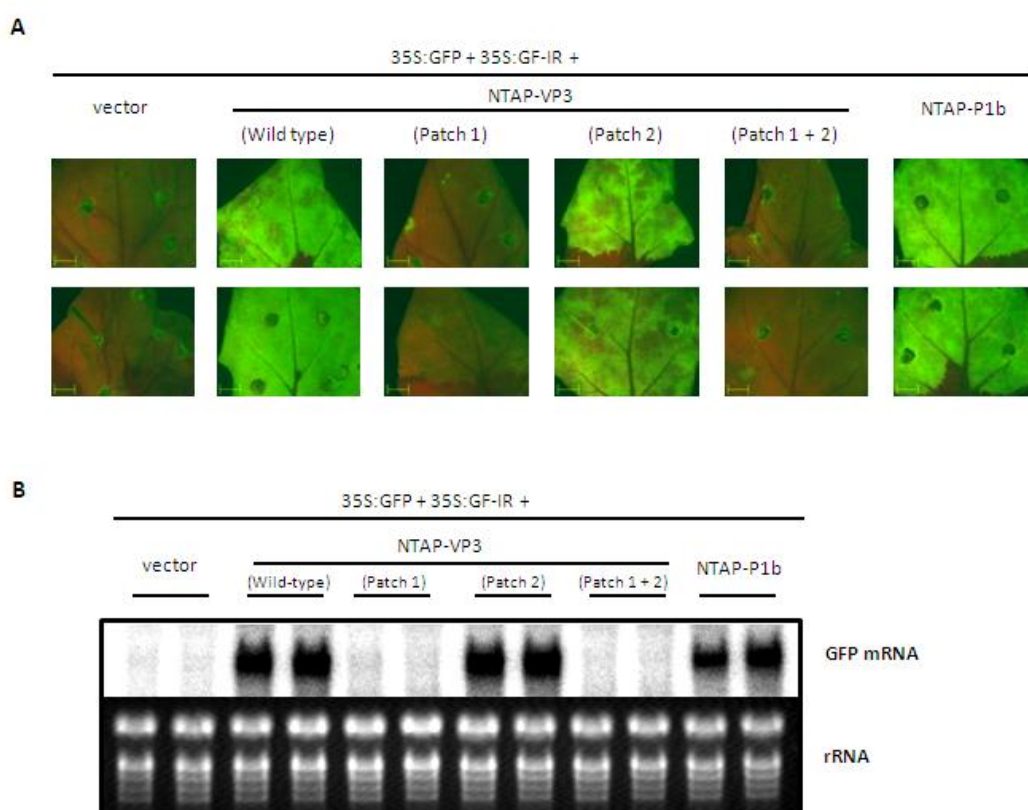


Figura 16. El motivo de unión al dsRNA de VP3 es crucial para la actividad supresora de silenciamiento en plantas *N. benthamiana*. **A.** Imágenes de fluorescencia GFP tomadas a los 6 d.p.a. bajo un microscopio de epifluorescencia de hojas infiltradas con las construcciones indicadas. **B.** Análisis Northern blot de la acumulación de mRNAs de la GFP. Hojas de *N. benthamiana* se infiltraron con el plásmido indicado para cada caso. Geles de rRNAs teñidos con Bromuro de Etidio se utilizaron como control de carga.

Estos resultados indican que la mutación en la región Patch1 elimina la capacidad de la proteína VP3 de suprimir el silenciamiento génico. En conjunto, estos resultados indican la existencia de una correlación directa entre la capacidad de interacción de la proteína VP3 con el dsRNA y su actividad como supresora de silenciamiento génico.

4.4.5. La proteína VP3 reemplaza funcionalmente al supresor de silenciamiento HCPro del virus de la sharka (PPV)

Nuestro siguiente objetivo fue comprobar si la proteína VP3 era capaz de suprimir el silenciamiento génico en el contexto de una infección viral. Para ello, se

utilizó un modelo experimental basado en la infección de plantas *N. benthamiana* con el virus de la sharka (PPV), un miembro de la familia *Potyviridae*.

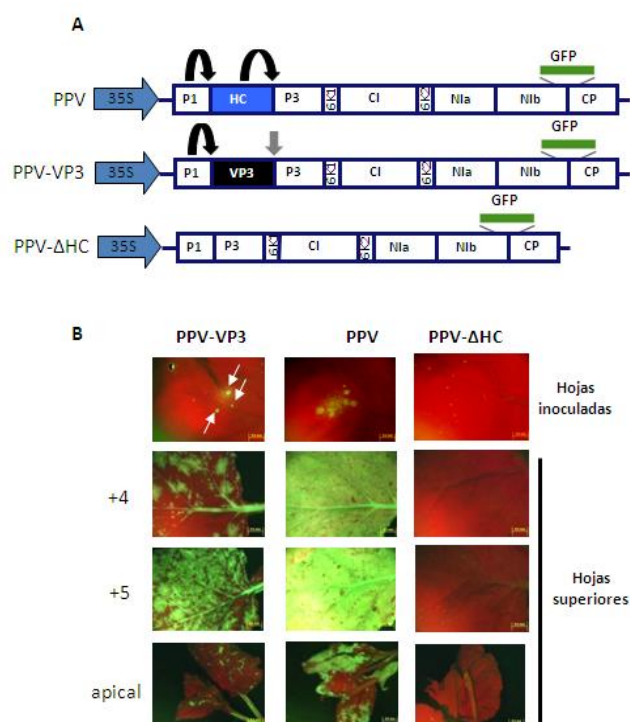


Figura 17. La proteína VP3 de IBDV es capaz de reemplazar funcionalmente a la proteína supresora de silenciamiento, HCPro, en una infección de PPV. A. Representación esquemática de los clones cDNA derivados de PPV y empleados para infectar biolísticamente plantas *N. benthamiana*. La secuencia codificante de la proteína GFP insertada entre los cistrones Nib y CP está representada por un rectángulo verde. Las flechas negras indican el autoprosesamiento correspondiente a las proteasas virales, mientras que la flecha gris indica el procesamiento *in trans* por la acción de NIaPro. **B.** Patrones de expresión GFP de plantas infectadas con los virus indicados. Imágenes de hojas inoculadas y recogidas 7 d.p.i., e imágenes de la cuarta (+4) y quinta (+5) hoja sobre la hoja inoculada y las hojas más apicales recogidas 22 d.p.i. Las imágenes fueron tomadas bajo un microscopio de fluorescencia utilizando los mismos tiempos de exposición.

El genoma de PPV codifica una proteína multifuncional denominada HCPro que juega un papel central en todos los procesos esenciales del ciclo viral (Maia y col. 1996). La proteína HCPro fue la primera proteína supresora de silenciamiento caracterizada (Anandalakshmi y col. 1998; Brigneti y col. 1998; Kasschau y Carrington 1998) y se ha demostrado que la infección por PPV es incapaz de progresar en ausencia de esta proteína (Di Nicola-Negri y col. 2005). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que, a pesar de que la supresión del silenciamiento es una función esencial, la infección no depende de la expresión de un supresor en particular. De hecho, se ha observado que la proteína HCPro de PPV puede ser reemplazada

funcionalmente de forma eficiente por otras proteínas supresoras de silenciamiento como P1b e CVYV (Carbonell y col. 2012) o NS1 del virus de la gripe (Maliogka y col. 2012).

Con el fin de determinar si la proteína VP3 era capaz de reemplazar funcionalmente al supresor de silenciamiento natural de PPV, HCPro, durante una infección, la región codificante correspondiente al polipéptido VP3 se clonó en un plásmido intermediario pGEMTp1p3 para generar pGEMTp1-VP3-p3. Este plásmido se empleó para reemplazar el fragmento equivalente en el cDNA genómico de una versión recombinante de PPV que contiene también la secuencia codificante de la proteína GFP para facilitar la monitorización de la infección, y se generó un cDNA infectivo denominado PPV-VP3 (Figura 17A). La proteína HCPro se expresa como parte de una poliproteína de la cual es escindida por la actividad serín-proteasa de la proteína viral P1 y por su propia actividad cisteín-proteasa. Para permitir la escisión de VP3, que carece de actividad autoproteolítica, ambos extremos de la secuencia codificante de VP3 se modificaron para introducir los sitios de corte reconocidos por P1 y Nla, la tercera proteasa de PPV. Por lo tanto, la proteína VP3 producida por PPV-VP3 contendrá dos residuos extra (SD) en su extremo N-terminal y una cola QVVVHQ en su extremo C-terminal.

Las plantas fueron inoculadas con el cDNA de PPV-VP3, así como con los clones de PPV salvaje y de un mutante de delección de HCPro previamente descrito (Maliogka y col. 2012), PPV- Δ HC, que se utilizaron como control positivo y negativo, respectivamente (Figura 17A). La infección se monitorizó por inspección visual bajo luz visible y mediante un microscopio de fluorescencia dado que los tres virus expresan la proteína GFP. Como era de esperar, a los 7 d.p.i. se observa expresión de GFP en todas las hojas inoculadas con el PPV salvaje, mientras que no se detecta expresión en las hojas inoculadas con PPV- Δ HC. Sin embargo, en las hojas inoculadas con PPV-VP3 también se detecta expresión de GFP (Figura 17B). Posteriormente, a los 22 d.p.i., se detectó la presencia de síntomas de infección y fluorescencia GFP en las hojas superiores de las plantas inoculadas tanto con PPV como con PPV-VP3, lo que indica que, además de inhibir el silenciamiento de GFP provocado por la ausencia de HCPro,

la proteína VP3 reemplaza a HCPro restableciendo la capacidad del virus PPV para establecer una infección sistémica en las plantas inoculadas (Figura 17B).

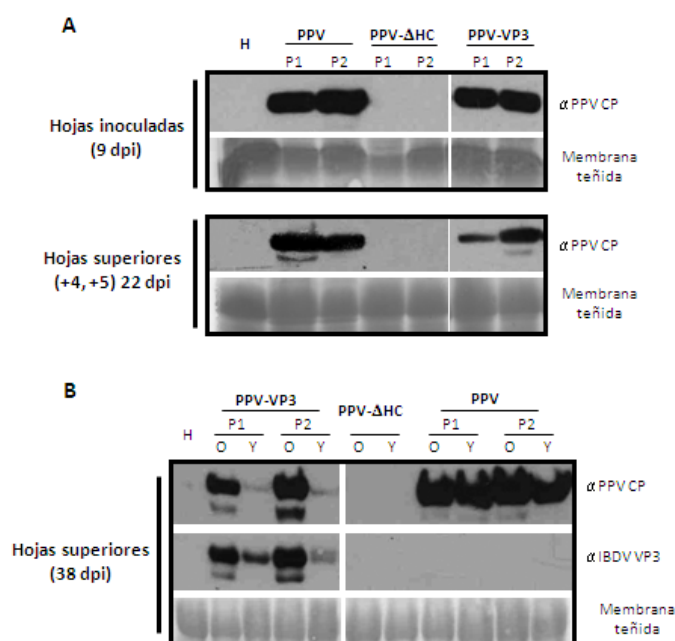


Figura 18. Análisis Western blot de los tejidos de plantas que mostraron fluorescencia GFP recogidas a distintos d.p.i. A. Hojas recogidas a los 9 d.p.i. en el caso de las hojas inoculadas (panel superior), y recogidas 22 d.p.i. en el caso de las hojas superiores no inoculadas (hojas +4 y +5) (panel inferior) de dos plantas infectadas independientemente (P1 y P2). **B.** Hojas antiguas (O) y jóvenes (Y) recogidas 38 d.p.i. de dos plantas *N. benthamiana* infectadas de forma independiente. Se utilizó un suero policlonal específico de la CP de PPV para comprobar la acumulación de virus, y se utilizó un suero específico para la proteína VP3 de IBDV para confirmar la identidad del virus quimera en cada caso. Membranas teñidas con rojo Ponceau y que muestran la proteína Rubisco se tomaron como control de carga.

El análisis mediante WB de muestras procedentes de los tejidos inoculados confirmó las observaciones visuales detectándose niveles similares de acumulación de PPV-VP3 y PPV salvaje en las hojas inoculadas. Por otra parte, se detectó la presencia de la proteína de la cápsida (CP) de PPV en hojas superiores no inoculadas de las plantas infectadas con PPV-VP3, aunque en menor cantidad que en las plantas infectadas por el PPV salvaje (Figura 18A). Observaciones a tiempos más largos (38 d.p.i.) mostraron que las plantas infectadas con PPV-VP3, pero no aquellas infectadas con PPV salvaje, se recuperaron de la infección viral (Figura 18B). Estas plantas no mostraban ni fluorescencia GFP ni síntomas de infección en las nuevas hojas (datos no mostrados). El proceso de recuperación se confirmó por análisis mediante WB de estas

muestras y mostraron una disminución en la acumulación de la proteína CP de PPV en las hojas más antiguas comparada con la de las hojas más jóvenes de las plantas infectadas con PPV-VP3. No se observó recuperación en las plantas infectadas con el PPV salvaje.

En conjunto, estos resultados indican que VP3 es capaz de reemplazar funcionalmente a la proteína supresora de silenciamiento del virus PPV, HCPro, en este sistema. El fenómeno de recuperación de las plantas infectadas se ha observado también en infecciones realizadas con diferentes PPV quimera que expresan otras proteínas supresoras de silenciamiento (Maliogka y col. 2012).

4.5. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LAS PROTEÍNAS HOMÓLOGAS A VP3 DE VIRUS DE LA FAMILIA BIRNAVIRIDAE

El siguiente objetivo de este trabajo consistió en estudiar las proteínas homólogas a VP3 de IBDV de otros virus de la familia *Birnaviridae* como el virus de la necrosis pancreática (IPNV), miembro prototipo del género *Aquabirnavirus*, y el virus X de *Drosophila* (DXV), único miembro del género *Entomobirnavirus*. Estudios previos han descrito que la proteína VP3 de IPNV es capaz de unir el genoma dsRNA del virus y formar RNPs (Hjalmarsson y col. 1999). Por otra parte, el silenciamiento génico ha sido descrito como un mecanismo antiviral eficiente contra el virus DXV (Zambon y col. 2006), sin embargo, se desconocen los mecanismos empleados por el virus para contrarrestar estas defensas. Con estos antecedentes, quisimos comprobar si las proteínas VP3 de IPNV y DXV eran capaces de interactuar con moléculas de dsRNA de distinto origen y de suprimir el silenciamiento génico.

4.5.1. Análisis de la unión al dsRNA de las proteínas VP3 de IPNV y DXV

Para determinar la capacidad de unión al dsRNA de estas proteínas se llevaron a cabo ensayos EMSA con moléculas de dsRNA genómico de IBDV así como con siRNAs de 21 nt. Se generaron los rBVs correspondientes que expresan las versiones recombinantes de ambas proteínas, denominadas hVP3IPNV y hVP3DXV, respectivamente, con un HT fusionado en el extremo N-terminal para permitir su

purificación mediante cromatografía de afinidad a metal a partir de infecciones de células de insecto. Concentraciones crecientes de las proteínas purificadas se incubaron con dsRNA genómico de IBDV o con moléculas sintéticas siRNA de 21 nt marcadas en el extremo 5' con [32 P]. Las incubaciones se llevaron a cabo durante 30 min a Tª ambiente y los complejos se resolvieron en geles de agarosa para los EMSAs realizados con dsRNA genómico, y en geles nativos de poliácridamida y autorradiografía para los EMSAs realizados con siRNAs.

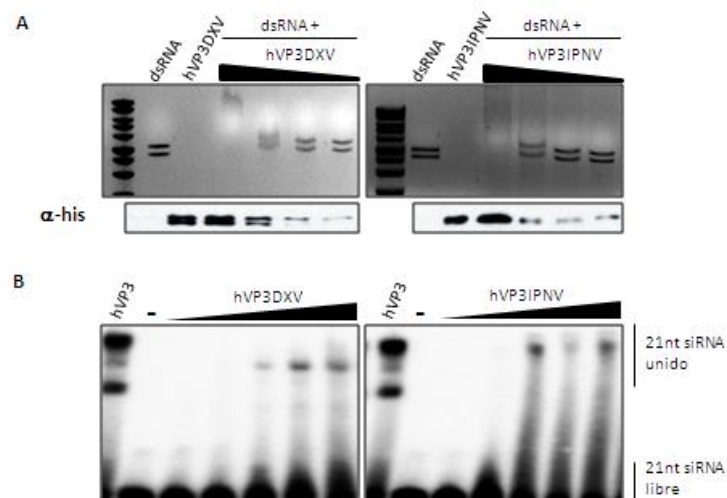


Figura 19. Análisis de la unión al dsRNA de los polipéptidos VP3 de los virus DXV e IPNV. A. EMSA con el dsRNA genómico de IBDV. Las proteínas hVP3 de DXV e IPNV purificadas en columna de afinidad (hVP3 DXV, concentración final: 68, 34, 17 y 8.5 nM; hVP3 IPNV, concentración final: 80, 40, 20 y 10 nM) se incubaron con el dsRNA genómico de IBDV (7.5nM concentración final). Los complejos dsRNA-proteína se resolvieron en geles de agarosa al 0.7% teñidos con Bromuro de Etidio. Estas mismas muestras se sometieron a SDS-PAGE, fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa y se incubaron con un suero anti-His. **B. EMSA con siRNAs de 21nt marcados con [32 P].** Las proteínas hVP3 de DXV e IPNV purificadas por cromatografía de afinidad a metal (hVP3 DXV, concentración final: 70, 140, 280, 560 y 1120 nM; hVP3 IPNV, concentración final: 80, 160, 320, 640, 1280 nM) se incubaron con siRNAs de 21nt marcadas con [32 P] (2nM concentración final). Los complejos siRNA-proteína se resolvieron en geles nativos de poliácridamida al 7% y revelados por autorradiografía.

En la figura 19A se observa la movilidad correspondiente al dsRNA genómico en la primera calle de cada gel. En cuanto a las proteínas hVP3IPNV y hVP3DXV, se observa retardo en la movilidad electroforética del dsRNA genómico en ambos casos. Así mismo, se observa un claro retardo de los siRNAs provocado por ambas proteínas (Figura 19B). Estos resultados indican que las proteínas hVP3IPNV y hVP3DXV son

capaces de interactuar tanto con moléculas de dsRNA genómico como con siRNAs de 21 nt en estos ensayos.

4.5.2. Análisis de la actividad supresora de silenciamiento génico de las proteínas VP3 de los birnavirus IPNV y DXV

A continuación se determinó la capacidad de las proteínas VP3 de IPNV y DXV para suprimir el silenciamiento de RNA empleando el modelo experimental descrito en el apartado 4.4.2. Las regiones codificantes de ambas proteínas fueron clonadas en el vector de expresión pNTAPi y los constructos resultantes que expresan las versiones recombinantes de estas proteínas con una fusión TAP N-terminal se transfirieron a *A. tumefaciens* para su posterior utilización en los ensayos de agroinfiltración. Se indujo el silenciamiento en plantas *N. benthamiana* mediante la infiltración de los plásmidos p35S:GFP y p35S:GF-IR descritos en el apartado 4.3.2.

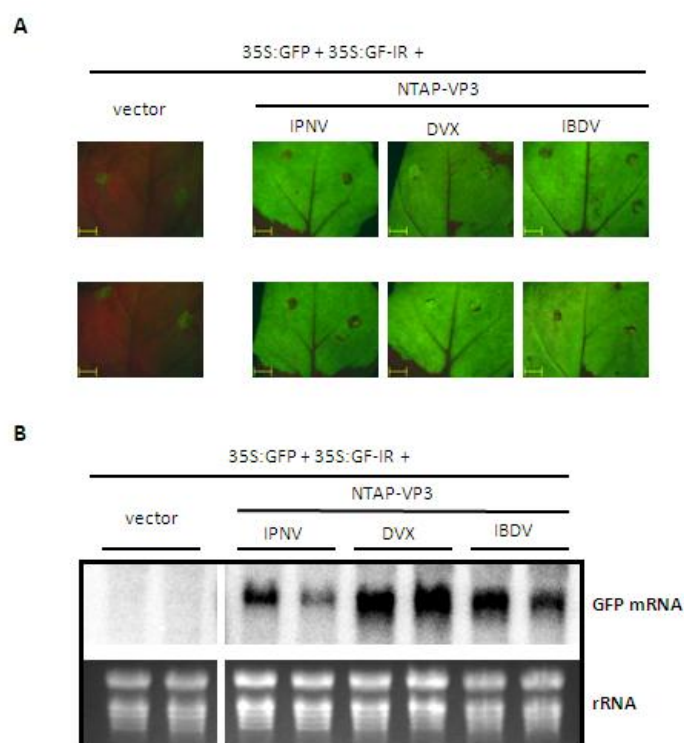


Figura 20. Las proteínas VP3 de los birnavirus DXV e IPNV suprimen el silenciamiento de RNA inducido por dsRNA. A. Imágenes de fluorescencia GFP tomadas a los 6 d.p.a. bajo un microscopio de epifluorescencia y utilizando los mismos tiempos de exposición para cada caso. **B.** Análisis Northern blot del mRNA de la GFP en las hojas de dos plantas distintas *N. benthamiana* agroinfiltradas para expresar los constructos indicados y recogidas 6 d.p.a. El rRNA de las muestras, teñido con Bromuro de Etidio se muestra como control de carga.

En la figura 20 observamos que las hojas infiltradas con p35S:GFP, p35S:GF-IR y el vector vacío pNTAPi muestran una potente disminución de la fluorescencia GFP a los 6 d.p.a. Por el contrario, las hojas infiltradas con p35S:GFP y p35S:GF-IR y que expresan las proteínas VP3 de IBDV, IPNV o DXV, muestran una intensa fluorescencia GFP. El análisis mediante Northern blot permite detectar altos niveles de acumulación del mRNA de GFP en las hojas infiltradas que expresan estas proteínas. Estos resultados nos indican que las proteínas VP3 codificadas por el genoma de IPNV y DXV muestran una capacidad supresora de silenciamiento génico similar a la observada para su proteína homóloga codificada por IBDV.

4.6. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN VP3-dsRNA MEDIANTE RESONANCIA DE PLASMÓN DE SUPERFICIE (SPR)

El análisis inicial mediante EMSA nos ha permitido identificar el motivo de unión al dsRNA de la proteína VP3. Este motivo denominado Patch1 consta de cuatro aminoácidos (K99, R102, K105 y K106) que presentan sus cadenas laterales expuestas en la superficie del dímero VP3 (Figura 7). La sustitución de esos residuos por ácido aspártico (D), elimina completamente la capacidad de la proteína VP3 de unir dsRNA (Figuras 9 y 15). Sin embargo, la aproximación experimental empleada no nos permitía realizar una caracterización molecular precisa del proceso de formación de los complejos VP3-dsRNA. Para obtener una comprensión más detallada de las interacciones proteína-RNA, la formación del complejo debe estudiarse no sólo en reacciones al equilibrio, sino también como un proceso dinámico. En este sentido, los biosensores basados en el fenómeno SPR permiten medir interacciones biomoleculares en tiempo real, proporcionando información sobre la cinética de dicha interacción (McDonnell 2001; Rich y Myszka 2002).

Los principales objetivos de este estudio fueron:

- Estudiar las constantes cinéticas y de afinidad en la formación del complejo VP3-dsRNA
- Determinar el tamaño mínimo de dsRNA capaz de formar el complejo

- Analizar la contribución de cada residuo electropositivo presente en el motivo Patch1 en la unión de la proteína al dsRNA

4.6.1. Estudio de las constantes cinéticas y de afinidad en la formación del complejo VP3-dsRNA

Para estos ensayos se utilizó un *sensor chip* SA con estreptavidina inmovilizada covalentemente a carboximetildextrano. En una de las celdas del chip se capturó dsRNA de 24 nt, biotinilado en uno de sus extremos 5'. Como superficie de referencia se utilizó una celda vacía. La secuencia del dsRNA empleado fue la misma que se utilizó en los ensayos EMSA descritos en el apartado 4.4.3. Con el fin de minimizar un posible efecto estérico que pudiera interferir con la unión a otras moléculas utilizadas en el análisis debido a la proximidad a la superficie del chip, se añadieron 3 nucleótidos espaciadores a la secuencia original de 21 nt (Figura 21A). Como analito se empleó la proteína hVP3 purificada de infecciones de células de insecto a diferentes concentraciones. En la figura 21A se muestran los sensogramas correspondientes a la inyección de diferentes concentraciones de la proteína hVP3 (20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 y 0.131 nM), procesados mediante la substracción de una doble referencia (explicado en Materiales y Métodos). Todos los análisis se realizaron por duplicado.

El análisis de los resultados se realizó mediante el software BIAevaluation 4.1, considerando al analito hVP3 como un dímero con un único sitio de unión a RNA. Los datos obtenidos se han ajustado al modelo de interacción 1:1 de Langmuir, introduciendo una corrección para la deficiencia en el transporte de masas. La interacción entre la proteína hVP3 y el dsRNA de 24 nt presenta una constante de la velocidad de asociación (k_a) de $2.95 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y una velocidad media de disociación (k_d) de $1.4 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, lo que resulta en una constante de afinidad aparente al equilibrio (K_D) calculada a partir de las constantes cinéticas k_a y k_d , de $4.75 \times 10^{-9} \text{ M}$.

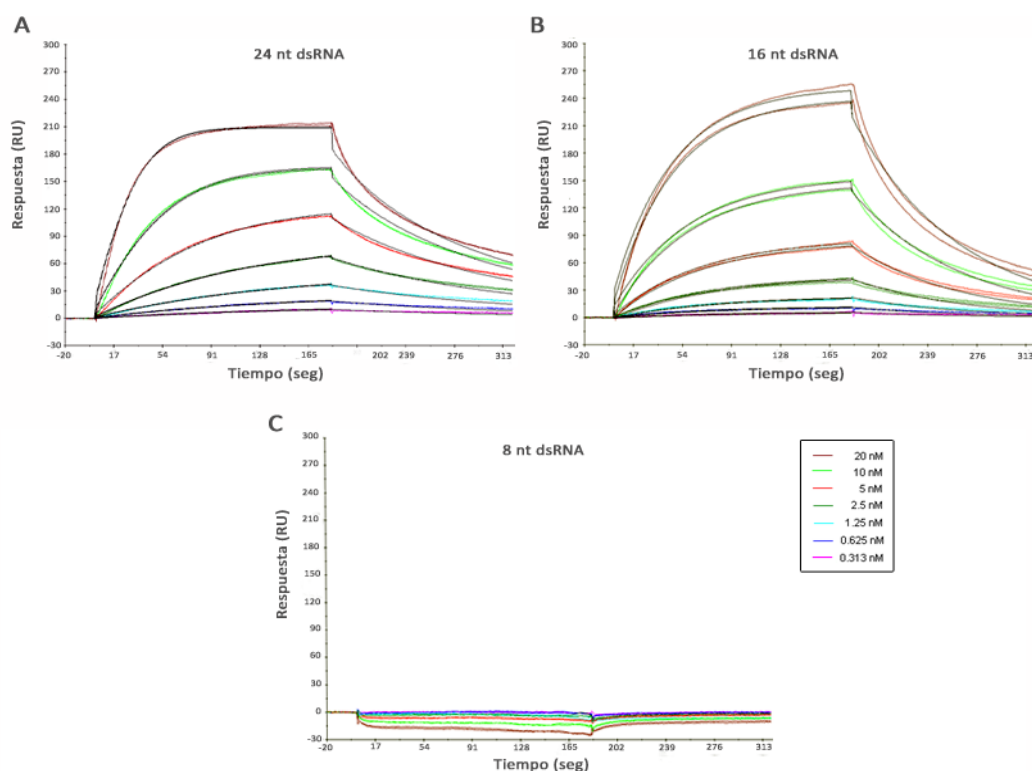


Figura 21. Análisis cinético de la interacción de VP3 con dsRNAs biotinilados de diferente longitud. Moléculas de dsRNA biotinilado de 24nt (A) 16nt (B) y 8nt (C), fueron capturadas en la superficie de un chip de estreptavidina. A continuación, se inyectó durante 3 min la proteína hVP3 purificada, a las concentraciones indicadas en el recuadro. Se muestran las señales obtenidas para las diferentes concentraciones de proteína inyectadas por duplicado. Las curvas en negro, muestran el ajuste “global” de los datos de cada sensorgrama a un modelo de interacción 1:1 de Langmuir e introduciendo una corrección para la deficiencia en el transporte de masas.

	Longitud dsRNA (nt)	k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (M)
Figura 19A	24	2.95×10^6	1.4×10^{-2}	4.75×10^{-9}
Figura 19B	16	1.29×10^6	3.15×10^{-2}	2.44×10^{-8}
Figura 19C	8	No detectable	No detectable	

Tabla 3. Constantes de velocidad de asociación (k_a), disociación (k_d) y de afinidad al equilibrio (K_D) para la interacción hVP3-dsRNA.

Con el objetivo de analizar el efecto de la disminución del tamaño del ligando en la formación del complejo VP3-dsRNA, se realizaron dos nuevas series de experimentos utilizando como ligando dsRNAs biotinilados de 8 y 16 nt de longitud. En la figura 21 se muestran los sensorgramas procesados correspondientes a la interacción de hVP3 con dsRNA de 16 nt (Figura 21B) y con dsRNA de 8 nt (Figura 21C). En la Tabla

3 se resumen las constantes de velocidad de asociación y de disociación, así como las constantes de afinidad aparente al equilibrio de los distintos complejos hVP3-dsRNA. En el caso de la interacción VP3-16nt dsRNA, los cálculos de las constantes cinéticas y de afinidad aparente al equilibrio se realizaron aplicando el mismo modelo de interacción 1:1 de Langmuir, introduciendo una corrección para la deficiencia en el transporte de masas. La constante de velocidad de asociación, $k_a = 1.29 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, y de disociación, $k_d = 3.15 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, y la constante de afinidad al equilibrio calculada a partir de las constantes cinéticas, $K_D = 2.44 \times 10^{-8} \text{ M}$, nos indican que la afinidad calculada para este complejo es aproximadamente 20 veces inferior a la observada para el ligando de 24 nt. Cuando se empleó como ligando el dsRNA de 8 nt no se detectó formación del complejo. Este resultado podría ser debido a que 8 nt no serían suficientes para generar un complejo estable en las condiciones de este ensayo. Y, por lo tanto, el tamaño mínimo de dúplex RNA suficiente para la formación del complejo con el dímero hVP3 debía estar entre 8 y 16 nt.

4.6.2. Determinación del tamaño mínimo de dsRNA requerido por la proteína VP3 para la formación del complejo

A continuación, nos propusimos determinar cuál era el tamaño mínimo necesario de dsRNA que se precisa para la formación del complejo con la proteína hVP3. Para llevar a cabo este análisis, se inmovilizó un dsRNA biotinilado de 24 nt en una celda, y como control se empleó una celda de flujo vacía. En un primer análisis se inyectó la proteína hVP3 a una concentración de 20 nM con un tiempo de contacto de 2 min. A continuación se inyectó tampón 1M NaCl, 50 mM NaOH durante 20 s para deshibridar el dúplex dsRNA, quedando únicamente sobre la superficie del chip la hebra biotinilada de cadena sencilla. Se comprobó que había perdido su capacidad de unir el analito inyectando la proteína hVP3 a una concentración de 10 mM, 5 veces superior a la empleada anteriormente, no observándose la formación del complejo (datos no mostrados).

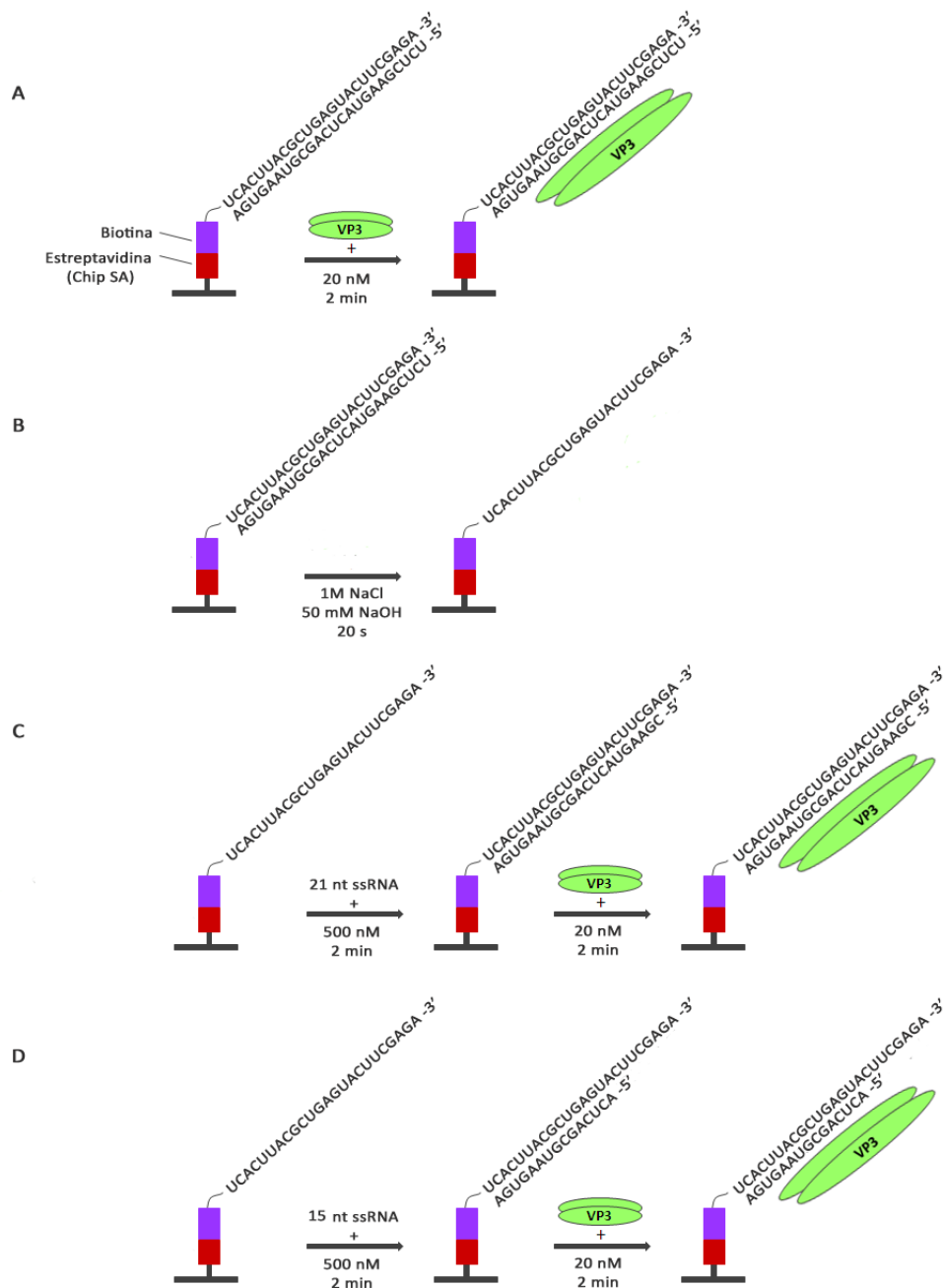


Figura 22. Esquema explicativo de los distintos procedimientos empleados en el ensayo. A. Unión del dímero hVP3 al ligando 24 nt-dsRNA. Moléculas biotiniladas de 24 nt-dsRNA son capturadas en la superficie del chip de estreptavidina. Posteriormente, se inyecta la proteína hVP3 purificada a una concentración de 20 nM con un tiempo de contacto de 2 min. **B. Deshibridación del dúplex RNA en la superficie del chip.** Se inyecta un tampón 1M NaCl, 500 mM NaOH durante 20 s en la superficie del chip y se obtiene la deshibridación del dúplex RNA quedando únicamente la hebra biotinilada unida al chip. **C y D. Hibridación de la hebra sencilla biotinilada de 24 nt con moléculas ssRNA de diferentes longitudes.** Moléculas de ssRNA de 21 nt (C) o 15 nt (D) complementarias a la hebra biotinilada unida al chip desde su extremo 5', se inyectan a una concentración de 500 nM durante 2 min. A continuación, se inyecta la proteína hVP3 purificada.

Posteriormente, se inyectaron moléculas de RNA de cadena sencilla (ssRNA) de diferentes longitudes (24, 21, 19, 17, 15, 13, 11 y 9 nt) –y complementarias desde el extremo 5' a la secuencia biotinilada que permanece unida a la superficie del chip-, a una concentración de 500 nM durante 2 min. A continuación, se inyectó una concentración constante de proteína hVP3 (20 nM) durante 2 min para determinar si la unión de dicha proteína al ácido nucleico se veía afectada por la longitud de la cadena complementaria de ssRNA, la cual previamente se había hibridado a la cadena biotinilada unida a la superficie del chip a través de su extremo 5', dejando los nucleótidos no apareados hacia el exterior. En la figura 22 se muestra un esquema explicativo de los procedimientos realizados.

Al inyectar ssRNA de 24 nt, se observó una recuperación de la señal de unión del ligando al chip a niveles similares a los obtenidos antes de la regeneración, con una capacidad de unión de la proteína hVP3 similar a la observada con el dsRNA original de 24 nt (datos no mostrados). Por otro lado, se observó que la disminución de la longitud del ssRNA inyectado para realizar la hibridación y formación de nuevos dúplex RNA sobre la superficie del chip, provoca una caída del nivel de unidades de resonancia (RUs) inmovilizadas. Esta disminución es atribuible a la menor masa molecular de los ssRNAs empleados o a una posible degradación del RNA durante la regeneración del chip. El RNA resultante forma una doble cadena incompleta puesto que la cadena complementaria biotinilada y unida al chip mantiene los 24 nt originales. Así mismo, la formación del complejo se ve afectada por la disminución del tamaño del oligonucleótido, produciéndose una menor interacción con VP3.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 23. En el gráfico se muestran los moles de proteína hVP3 unida a la superficie del chip en porcentaje normalizado frente a los moles de dúplex RNA pegados al chip en cada caso. Observamos que al hibridar un ssRNA de 21 nt a la hebra biotinilada de 24 nt, la cantidad de proteína hVP3 que se une a este dúplex de RNA es un 50% inferior a la observada con el dúplex RNA de 24 nt. La cantidad de proteína unida se mantiene en cantidades similares en el caso de los dúplex de 19 y 17 nt. Por lo tanto, en base a estos resultados, la disminución de entre 3 y 7 nt en la longitud del dsRNA regenerado en la superficie del chip provoca

una disminución de la interacción del 50% lo que podría ser atribuible a la desaparición de un sitio de unión a la proteína hVP3 en el dsRNA.

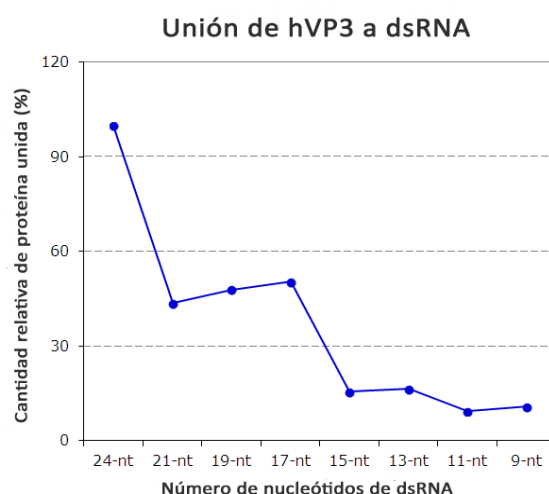


Figura 23. Unión de hVP3 a moléculas de diferentes longitudes de dsRNA biotinilado presentes en la superficie del chip. Se muestra la cantidad relativa de moles de hVP3 unida por moles de dsRNA en porcentaje.

Por otra parte, al regenerar los dúplex RNA de la superficie del chip con moléculas ssRNA de 15, 13, 11 o 9 nt, observamos que la cantidad de proteína unida disminuye un 30% respecto de la cantidad unida a los dúplex RNA de 17, 19 o 21 nt, y más de un 80% respecto de la cantidad unida al dúplex RNA de 24 nt. Por el momento desconocemos si la marcada disminución en la cantidad de proteína unida a los dúplex RNA más pequeños se debe a una pérdida de afinidad de la proteína o a la desaparición de otro sitio de unión en el dsRNA.

Hemos podido observar que la interacción con el dímero hVP3 ocurre con todos los tamaños de dsRNA empleados en el ensayo. Incluso en el caso del dúplex RNA de 9 nt, se observa una señal que, aunque no muy alta, es superior a la detectada en la celda de referencia, lo que indica que se produce la interacción. Tal y como conocemos por los resultados del apartado 4.6.1., un dsRNA de 8 nt no es suficiente para que se detecte la interacción entre hVP3 y dicho dsRNA. Sin embargo, en base a los resultados obtenidos en este último ensayo, podemos interpretar que el tamaño mínimo de dúplex RNA suficiente para que ocurra la interacción hVP3-dsRNA sería de 9 nt cuando una de las dos cadenas de RNA es de mayor longitud.

4.6.3. Análisis de la contribución de cada residuo del motivo Patch1 en la unión al dsRNA

En una etapa posterior, se analizó la interacción de las versiones mutantes hVP3Patch1 y hVP3Patch2 con el dsRNA biotinilado de 24 nt. Se empleó como superficie de referencia una celda sin tapizar y como control positivo del experimento se utilizó la proteína hVP3 a la misma concentración y con las mismas condiciones experimentales. En la figura 24 se muestra una superposición de los sensogramas procesados correspondientes a la inyección de las diferentes proteínas (hVP3, hVP3Patch1 y hVP3Patch2) a una concentración de 6 $\mu\text{g/ml}$ durante 3 min. Los resultados observados corroboran los obtenidos mediante ensayos EMSA descritos en los apartados 4.2.2 y 4.4.4.: no se observa interacción de la proteína hVP3Patch1 con el dsRNA de 24 nt; y la señal de asociación observada para la proteína hVP3Patch2 es mucho menor que la observada con la proteína hVP3, indicando que esta interacción tiene una afinidad muy inferior a la de la proteína hVP3.

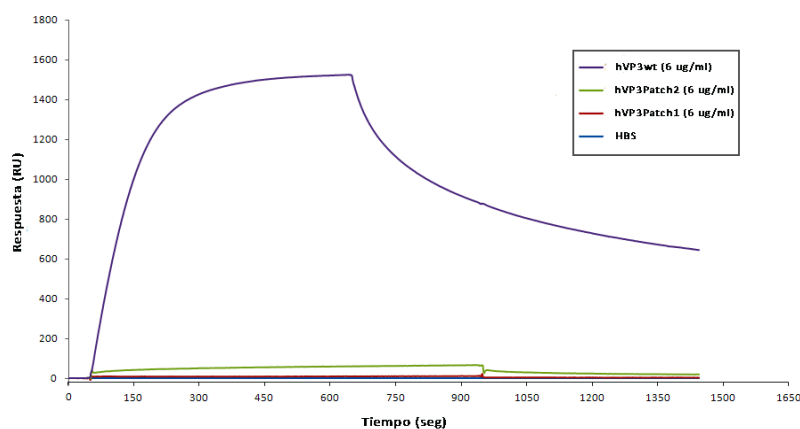


Figura 24. Análisis de la interacción de las proteínas hVP3wt, hVP3Patch1 y hVP3Patch2 con el dsRNA de 24nt. Moléculas de dsRNA biotinilado de 24nt fueron capturadas en la superficie de un chip de estreptavidina. A continuación, se inyectaron las proteínas hVP3wt, hVP3Patch1 y hVP3Patch2 durante 3 min a las concentraciones indicadas en el recuadro. Se muestran las señales obtenidas para las diferentes proteínas inyectadas.

A continuación, quisimos determinar la contribución de cada uno de los residuos correspondientes a la región Patch1 en la interacción con el dsRNA. Los datos previos indicaban que la sustitución de los cuatro residuos básicos por ácido aspártico (D) elimina completamente la capacidad de interacción. Por lo tanto, para determinar

si los cuatro residuos están implicados en dicha interacción o sólo alguno de ellos en particular, se generaron mutantes simples de la región Patch1 de hVP3 (hVP3K99D, hVP3R102D, hVP3K105D y hVP3K106D). Para llevar a cabo estos análisis, se inmovilizó un dsRNA biotinilado de 24 nt en una celda y como control se empleó una celda de flujo vacía. Se inyectaron tres concentraciones (50, 100 y 200 nM) de las proteínas purificadas con un tiempo de contacto de 1 min.

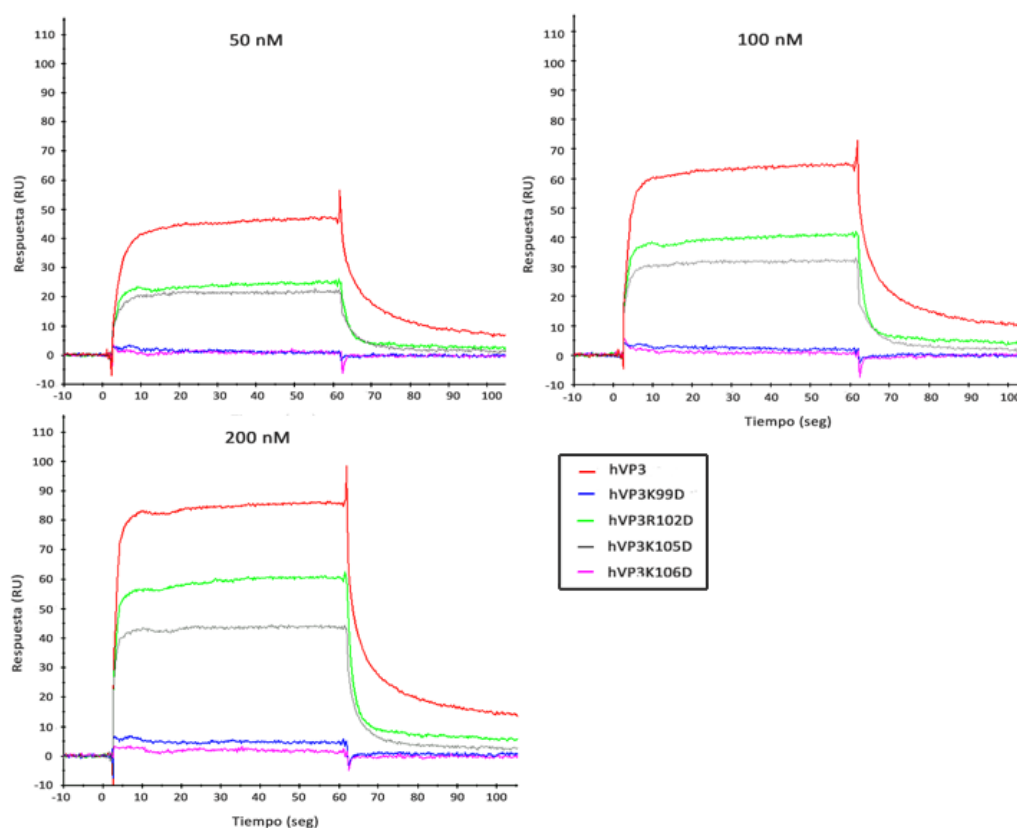


Figura 25. Análisis de la interacción de mutantes puntuales de la región Patch1 de hVP3 con dsRNA biotinilado de 24 nt. Moléculas de dsRNA biotinilado de 24nt fueron capturadas en la superficie de un chip de estreptavidina. Una celda sin tapizar se empleó como celda de referencia. A continuación, se inyectaron las proteínas hVP3, hVP3K99D, hVP3R102D, hVP3K105D y hVP3K106D a las concentraciones indicadas. Se muestra una superposición de los sensogramas procesados obtenidos para cada proteína a cada concentración indicada.

En la figura 25 se muestran los sensogramas procesados correspondientes a las tres concentraciones distintas de cada proteína mutante. Tal y como se observa, las proteínas mutantes hVP3R102D y hVP3K105D mantienen la capacidad de interactuar con el dsRNA de 24 nt, aunque la señal observada es inferior a la observada al inyectar la proteína hVP3wt; mientras que no se observa interacción alguna en el caso de los

mutantes hVP3K99D y hVP3K106D a ninguna de las concentraciones analizadas. Por lo tanto, estos resultados indican que los residuos K99 y K106 son los principales responsables de la interacción hVP3-dsRNA. La señal observada en el caso del mutante hVP3R102D es, a las tres concentraciones analizadas, ligeramente superior a la señal del mutante hVP3K105D.

Finalmente, para corroborar estos resultados, decidimos generar dobles mutantes en la región Patch1 (hVP3K99D/R102D, hVP3K99D/K105D, hVP3K99D/K106D, hVP3R102D/K105D, hVP3K102D/K106D y hVP3K105D/K106D) y analizar su interacción con moléculas dsRNA biotiniladas de 24 nt. En la figura 26 se muestran los sensogramas procesados correspondientes a tres concentraciones distintas de cada doble mutante (50, 100 y 200 nM). Como control, se inyectó la proteína hVP3 a las mismas concentraciones. Mediante este análisis final pudimos comprobar que, como era de esperar, tan solo el mutante doble hVP3R102D/K105D que mantiene inalterables los residuos K99 y K106 es capaz de interaccionar con el ligando dsRNA aunque la señal de este mutante doble es ligeramente inferior a la observada con la proteína hVP3 y similar a la observada con los mutantes puntuales hVP3R102D y hVP3K105D (Figura 25). En conclusión, estos resultados nos indican que los dos residuos básicos K99 y K106 son imprescindibles para la interacción VP3-dsRNA ya que la sustitución de cualquiera de ellos elimina por completo la capacidad de unión al ligando dsRNA de la proteína VP3.

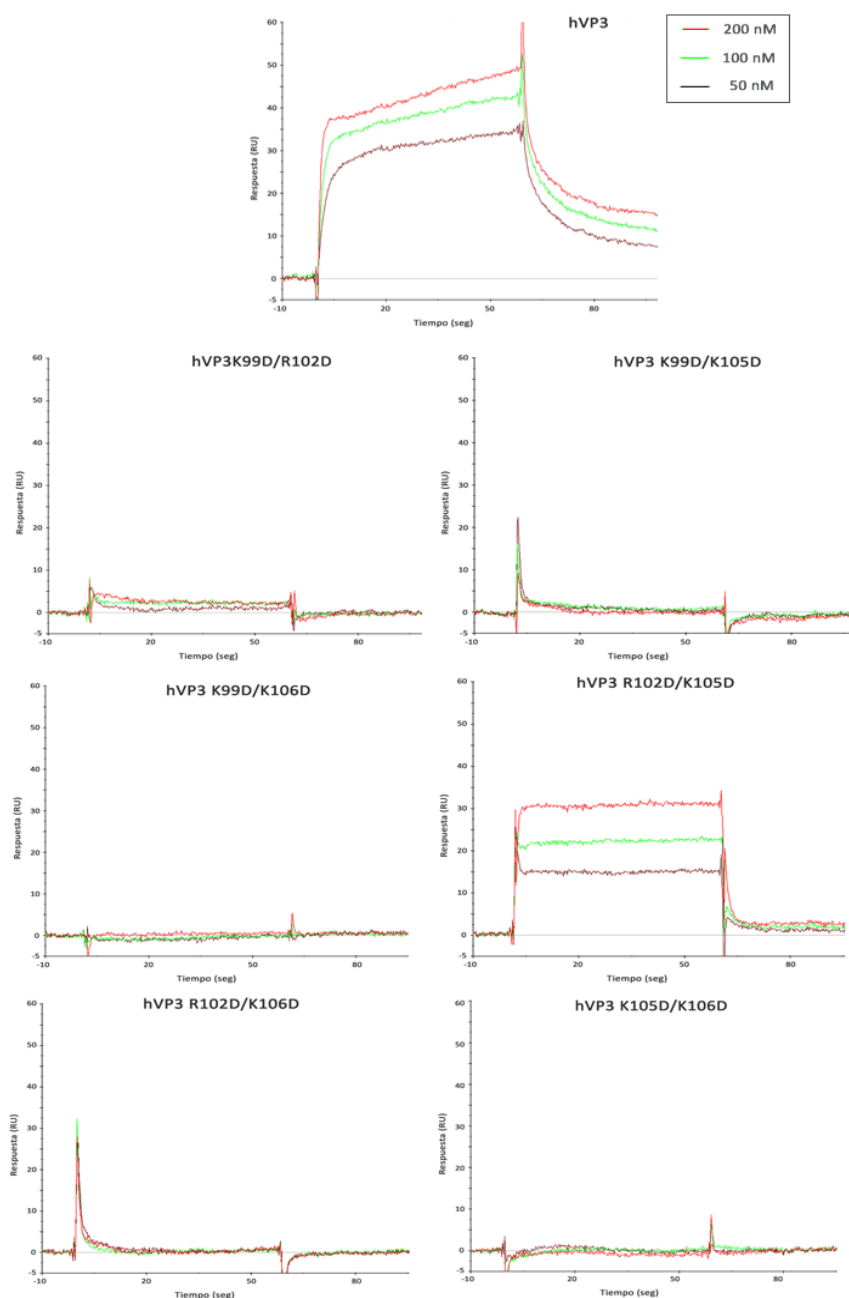


Figura 26. Análisis de la interacción de los mutantes dobles de hVP3 con el dsRNA de 24nt. Moléculas de dsRNA biotinilado de 24nt fueron capturadas en la superficie de un chip de estreptavidina. A continuación, se inyectaron las distintas proteínas mutantes durante 1 min a las concentraciones indicadas en el recuadro. Se muestran los sensogramas procesados correspondientes a las tres concentraciones de cada proteína mutante. Como control, se muestra el sensograma procesado correspondiente a hVP3 a las mismas concentraciones.

5 DISCUSIÓN

Los birnavirus poseen diversas características estructurales que los diferencian de otros virus icosaédricos con genoma dsRNA (Ahlquist 2006). Los virus dsRNA prototípicos, como los reovirus, poseen dos o más cápsidas concéntricas y durante el ciclo replicativo su genoma permanece permanentemente encerrado en la cápsida interior conocida como núcleo T = 2 (Lawton y col. 2000). Además de contener toda la maquinaria enzimática necesaria para la síntesis, modificación post-transcripcional y extrusión de los mRNAs virales, esta estructura evita el reconocimiento del genoma viral por sensores de dsRNA celulares (Patton y col. 2007). Por el contrario, los birnavirus poseen una única cápsida con geometría T = 13I (Böttcher y col. 1997; Castón y col. 2008) cuyo interior está ocupado por RNPs formadas por los segmentos genómicos del virus covalentemente unidos en sus extremos 5' a la forma VPg de la RdRp viral y asociados en toda su extensión a moléculas de VP3 (Luque y col. 2009).

Por el momento, se desconoce si las partículas virales son desensambladas durante el proceso de entrada a la célula. Sin embargo, estudios previos han demostrado que las RNPs purificadas son transcripcionalmente activas *in vitro* (Luque y col. 2009). Así mismo, estudios recientes del laboratorio han demostrado que estas RNPs son transcripcionalmente activas *in vivo* ya que se ha determinado que la transfección del genoma viral desnudo a células que expresan versiones recombinantes de las proteínas VP3 y VP1 da lugar a la producción de viriones infectivos de IBDV (Dalton RM, comunicación personal). Estas observaciones sugieren la posibilidad de que durante los primeros estadios del ciclo replicativo se produzca el desensamblaje de la cápsida viral y la liberación de las RNPs que actuarían como maquinaria de transcripción independiente de la cápsida viral. En este escenario, el polipéptido VP3 jugaría un papel fundamental ocultando el dsRNA frente a los sensores celulares y previniendo así la activación de la respuesta innata mediada por el dsRNA genómico viral.

5.1. Evasión de la apoptosis inducida por la activación de PKR

Estudios previos del laboratorio demostraron que la expresión del gen VP2 de IBDV induce el bloqueo de la síntesis proteica, la degradación del rRNA y una potente respuesta apoptótica en distintas líneas celulares (Fernández-Arias y col. 1997). Sin embargo, al inicio del presente estudio se desconocían los mecanismos moleculares que provocaban este conjunto de repuestas celulares. Para caracterizar en mayor profundidad este fenómeno, hemos empleado el sistema de expresión basado en la utilización de virus recombinantes inducibles de VACV mediante el sistema de expresión VOTE (Ward y col. 1995).

Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que el bloqueo de la síntesis proteica y la respuesta apoptótica inducida por la expresión del gen VP2 de IBDV en células HeLa son precedidos por la fosforilación de PKR y del factor de iniciación de la traducción eIF2 α . Además, la expresión conjunta de una forma mutante dominante negativa no fosforilable de PKR (PKR-NP) y VP2 previene la fosforilación de PKR, la subsecuente fosforilación de eIF2 α , el bloqueo de la síntesis proteica y la apoptosis en células HeLa. Conjuntamente, estos resultados indican que la expresión de VP2 provoca una respuesta apoptótica mediada por la activación de PKR.

PKR es activada bien por su unión al dsRNA o a través de la interacción con distintos polipéptidos (Williams 1999). Con la información disponible, es difícil discriminar si la activación de PKR observada en células que expresan la proteína VP2 es debida a la acumulación del polipéptido o a la de sus mRNAs. Es conocido que los dúplex imperfectos de RNA son capaces de activar PKR (Kaufman 2000), de hecho, se ha observado que las regiones 3' no codificantes de los mRNAs de algunas proteínas del citoesqueleto como la tropomiosina, la troponina o la actina cardíaca, interaccionan con PKR y la activan (Nausbaum y col. 2002). Las predicciones *in silico* sugieren la presencia de largas regiones de RNA formando dúplex en los transcritos de la secuencia codificante de VP2 (Figura 25). Esta observación sugiere que la acumulación de los mRNAs de VP2 podría ser suficiente para dar lugar a la activación de PKR. Así mismo, la gran eficiencia transcripcional del sistema de expresión VOTE hace posible pensar que la cantidad de mRNAs de VP2 producida en las células

infectadas por el virus VT7/VP2 podría sobrepasar la cantidad disponible de la proteína de unión a dsRNA, E3, expresada por VACV, permitiendo, de este modo, la presencia de una población de mRNAs de VP2 “libre” suficiente para provocar la activación de PKR.

El hecho de que la expresión de VP2 induzca apoptosis en distintas líneas celulares contrastaba con resultados previos del laboratorio en los que tras la expresión de la poliproteína completa de IBDV se obtenían VLPs de IBDV en ausencia de una respuesta apoptótica detectable (Fernández-Arias y col. 1998). Esta observación sugería que algún factor codificado por la poliproteína era capaz de contrarrestar el efecto proapoptótico provocado por la expresión de VP2. De acuerdo a la información disponible, la proteína VP3 parecía una excelente candidata para ejercer ese papel. Al igual que otras proteínas virales implicadas en la inhibición de la apoptosis, VP3 posee la capacidad de formar complejos con dsRNA de una forma independiente de secuencia. Los datos descritos en el presente trabajo demuestran que la expresión de VP3 previene el bloqueo de la síntesis proteica y la respuesta apoptótica inducida por la expresión de VP2, inhibiendo la activación de PKR, la subsecuente fosforilación de eIF2 α y la activación de la cascada apoptótica.

Resultados previos del laboratorio habían demostrado que el efecto apoptótico asociado a la expresión de VP2 no está directamente relacionado con el empleo del sistema de expresión VOTE. De hecho, se observó un efecto similar tras la expresión de la proteína VP2 en células transfectadas con el plásmido pcDNA-VP2, derivado del vector de expresión eucariota pcDNA3, en el que el gen VP2 se encuentra bajo el control del promotor inmediatamente temprano del citomegalovirus humano (CMV) y su transcripción se lleva a cabo por la RNA polimerasa II del hospedador (Fernández-Arias y col. 1997). Además, se ha determinado que la expresión de otros genes virales y celulares con el sistema VOTE, incluyendo el polipéptido VP3 de IBDV, no provoca alteraciones en la síntesis proteica ni apoptosis en las células infectadas (Fernández-Arias y col. 1997). Finalmente, los resultados obtenidos en este estudio empleando el sistema de expresión VOTE fueron corroborados coexpresando los polipéptidos VP2 y VP3 mediante transfección de células HeLa con los vectores de expresión plasmídicos pcDNA-VP2 y pcDNA-VP3 (Busnadiego y col. 2012).

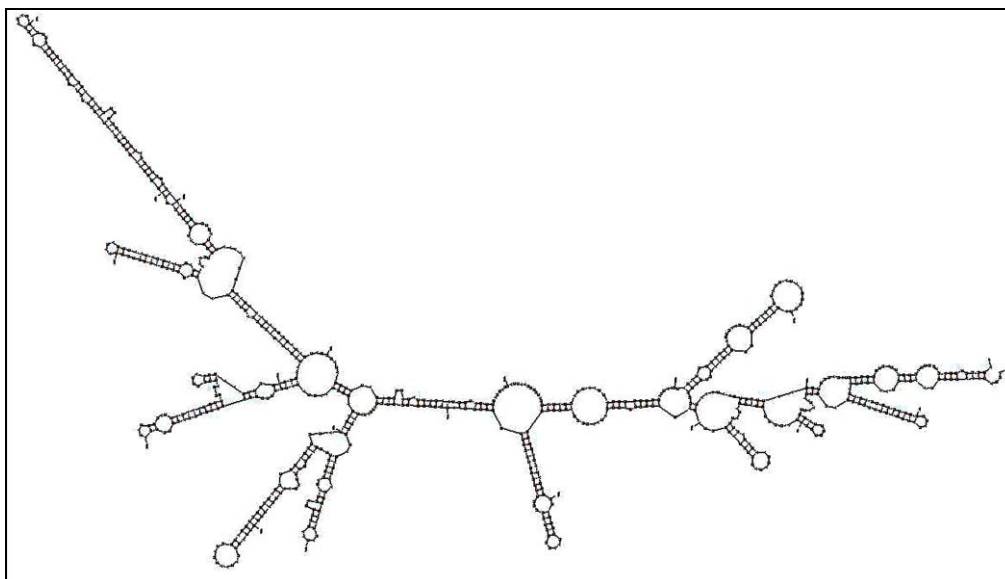


Figura 27. Predicción de la estructura secundaria del transcrito del gen VP2. La predicción se obtuvo mediante el servidor Mfold (<http://mfold.rna.albany.edu>).

El mecanismo por el cual la proteína VP3 previene la activación de PKR inducida por la expresión de VP2 debe ser estudiado en mayor profundidad. Se ha demostrado que VP3 interacciona con la región C-terminal del precursor pVP2 pero no con la forma madura VP2 (Oña y col. 2004) lo que excluye la posibilidad de que el efecto ejercido por la expresión de la proteína VP3 sea debido a un posible secuestro de la proteína VP2 mediante la interacción directa con VP3. Una posibilidad que no podemos descartar es la existencia de una posible interacción directa o indirecta de la proteína VP3 con PKR. A este respecto, se han descrito varias proteínas virales como NS1 del virus de la gripe o E3 de VACV, que poseen propiedades antiapoptóticas y que son capaces de interactuar con PKR (Romano y col. 1998; Tan y col. 1998). Así mismo, dado que sabemos que VP3 es hiperfosforilada en células infectadas con IBDV (Oña A, comunicación personal), sería interesante estudiar la posibilidad de que VP3 actúe como un pseudosustrato de PKR, previniendo la fosforilación de eIF2 α tal y como se ha descrito para el polipéptido K3 del virus VACV (Carroll y col. 1993).

No obstante, la capacidad de VP3 de unir tanto RNAs de cadena sencilla (ssRNA), como los segmentos genómicos dsRNA de IBDV (Kochan y col. 2003) y dúplex cortos (21 pb) de dsRNA (Valli y col. 2012) sugiere que el mecanismo fundamental utilizado por VP3 para el control de la activación de PKR inducida por VP2 podría

involucrar la unión de las regiones de doble cadena presentes en las moléculas mRNA de VP2, previniendo así su reconocimiento por PKR. Esta hipótesis resulta fortalecida por el hecho de que la expresión de una versión mutante de VP3, VP3Patch1, incapaz de unir moléculas de dsRNA, no previene la fosforilación de PKR inducida por la expresión de VP2.

Si esta hipótesis es correcta, la presencia de VP3 en células infectadas con IBDV, así como en células que expresan la poliproteína de IBDV, podría contrarrestar el efecto de los mRNAs de la región codificante de VP2, evitando así su efecto proapoptótico.

5.2. Homología funcional de VP3 con la proteína moduladora de la respuesta innata antiviral E3 del virus vacunal VACV

La proteína E3 de VACV es un polipéptido de 25 kDa con capacidad de unión a dsRNA que se expresa a tiempos tempranos tras la infección. Esta proteína juega un papel esencial en la resistencia de VACV frente al interferón y en el control de la respuesta apoptótica inducida por la replicación viral en células infectadas. Se ha demostrado que un mutante de delección, denominado WR/ Δ E3L, derivado de la cepa WR de VACV que carece del gen E3L y que, por tanto, no expresa la proteína E3, presenta una fuerte restricción en su rango de hospedador, siendo incapaz de replicar en sistemas celulares que, como las células HeLa, presentan niveles basales relativamente elevados de las proteínas PKR y OAS (Beattie y col. 1996). Sin embargo, la inserción de genes recombinantes que codifican proteínas de unión a dsRNA de distintos virus como NS1 del virus de la gripe (Guerra y col. 2011), sigmaA del reovirus aviar (González-López y col. 2003), o la proteína NSP3 del rotavirus porcino (Langland y col. 1994), en el genoma del virus WR/ Δ E3L da lugar a la generación de virus recombinantes capaces de superar la restricción impuesta por la carencia del gen E3L. Los resultados descritos en el presente trabajo sugerían la posibilidad de que VP3 podría reemplazar funcionalmente a la proteína E3.

Mediante la inserción del gen VP3 de IBDV en el genoma del virus WR/ Δ E3L se generó el virus recombinante WR/ Δ E3LVP3. Los resultados descritos en este estudio indican que el virus recombinante WR/ Δ E3LVP3 es capaz de replicar eficazmente en células HeLa no permisivas para el virus parental WR/ Δ E3L. El virus WR/ Δ E3LVP3 produce en estas células placas de lisis de tamaño similar a las generadas con el virus WR, mientras que, como se había descrito previamente (Chang y col. 1995), el virus parental WR/ Δ E3L es incapaz de formar placas en esta línea celular. Por otra parte, los resultados obtenidos demuestran que el tamaño de las progenies virales producidas por el virus WR/ Δ E3LVP3 en cultivos de células HeLa son similares a las observadas en cultivos infectados con el virus WR.

Estos resultados demuestran que la proteína VP3 de IBDV es capaz de reemplazar funcionalmente al polipéptido E3 de VACV, restableciendo la capacidad del mutante de delección WR/ Δ E3L para replicar en células HeLa. A pesar de que un análisis comparativo de las secuencias de VP3 y E3 no reveló la existencia de similitudes significativas entre ambas, los datos recogidos en el presente trabajo sugieren que VP3 podría ejercer una función similar a E3 en células infectadas por IBDV contrarrestando la respuesta innata del hospedador.

5.3. VP3 suprime el silenciamiento génico

Las plantas han sido ampliamente utilizadas para identificar y estudiar supresores virales del silenciamiento derivados de virus que infectan vertebrados ya que la interpretación de los resultados obtenidos no se ve afectada por la presencia de otros mecanismos de defensa antiviral activables por dsRNA específicos de vertebrados tales como la ruta de interferón (Bucher y col. 2004; Delgadillo y col. 2004; Quian y col. 2009; Karjee y col. 2011). En el presente trabajo se decidió caracterizar el potencial de la proteína VP3 como posible agente supresor de silenciamiento mediante el empleo de un modelo experimental basado en la agroinfiltración de vectores plasmídicos en plantas de *Nicotiana benthamiana*. Para ello, se desarrollaron dos sistemas experimentales complementarios. En primer lugar, se indujo el silenciamiento de RNA mediante la expresión del gen reportero GFP cuyo transcrito es

convertido en dsRNA por una RdRp del hospedador (Baulcombe 2006; García-Ruiz y col. 2010). En el segundo ensayo, el silenciamiento se indujo mediante la expresión de una construcción que provoca de forma directa la formación de moléculas de dsRNA específicas de GFP. En ambos casos, se determinó que la proteína VP3 protege el mRNA de la GFP de la degradación mediada por el silenciamiento génico evitando la generación de pequeñas moléculas de RNA interferentes. Estos resultados indican que VP3 actúa tras la formación de moléculas de dsRNA, observación que concuerda con la naturaleza dsRNA de los genomas de los birnavirus.

Muchas proteínas supresoras de silenciamiento son capaces de unir el dsRNA, sin embargo, no todas las proteínas de unión a dsRNA poseen la capacidad de suprimir el silenciamiento génico (Lichner y col. 2003; Mèrai y col. 2006). Mientras que algunas proteínas supresoras de silenciamiento unen moléculas largas de dsRNA e interfieren con la actividad procesiva de Dicer (Mèrai y col. 2006; Chao y col. 2005; van Rij y col. 2006; Fenner y col. 2006), otras secuestran específicamente las moléculas de siRNA e impiden su reconocimiento por el complejo RISC (Vargason y col. 2003; Ye y col. 2003; Lakatos y col. 2006; Hemmes y col. 2007; Valli y col. 2011). Los resultados obtenidos en este estudio muestran que además de la capacidad de interactuar con moléculas largas de dsRNA (Kochan y col. 2003), VP3 es capaz de unir pequeñas moléculas de dsRNA de distintos tamaños, incluyendo aquellas con una longitud de 21 nucleótidos, el tamaño de los siRNAs comúnmente producidos durante las infecciones por virus RNA.

Como era esperable, la proteína supresora de silenciamiento P1b del CVYV, que actúa interactuando específicamente con los siRNAs de 21 nucleótidos (Valli y col. 2011), afectó a la acumulación de siRNAs secundarios. Sin embargo, no se observaron niveles detectables de siRNAs primarios ni secundarios derivados de la expresión de GFP en las hojas que expresaban la proteínas VP3 de IBDV o NS1 del virus de la gripe. Estos datos apoyan la hipótesis de que tanto VP3 como NS1 podrían emplear un modo de acción dual, diferente al utilizado por la proteína P1b, que bloquearía tanto el procesamiento de las moléculas largas de dsRNA y la producción de siRNAs por parte de Dicer como la incorporación de los siRNAs al complejo efector RISC. Esta hipótesis resulta reforzada por el hecho de que la expresión de la versión mutante de VP3,

VP3Patch1, incapaz de interactuar con el dsRNA, es también incapaz de suprimir el silenciamiento génico en este sistema.

Estos resultados apoyan la implicación del motivo de unión al dsRNA de VP3 en la actividad supresora de silenciamiento génico. Sin embargo, no nos permiten discriminar la importancia relativa de la protección del dsRNA y del secuestro de siRNAs, ya que la mutación analizada provoca un efecto deletéreo similar sobre la capacidad de interacción de la proteína con los dos tipos de moléculas de dsRNA analizadas. Es interesante resaltar que la expresión de la versión mutante de VP3, VP3Patch2, capaz de interactuar, aunque débilmente, con los dos tipos de dsRNA analizados retiene la capacidad de suprimir el silenciamiento en este sistema. Este resultado indica que, como se observó previamente con la proteína P1b (Valli y col. 2011), el mantenimiento de una capacidad residual de unión al dsRNA es suficiente para contrarrestar eficazmente el funcionamiento de la maquinaria de silenciamiento.

A pesar de que un amplio rango de virus de insecto son capaces de inducir el silenciamiento de RNA, solamente se han identificado proteínas supresoras de silenciamiento en virus RNA de cadena positiva ((+)ssRNA) (Han y col. 2011; Blair 2011). Curiosamente, se ha descrito que el silenciamiento génico es una respuesta antiviral eficiente contra DXV, un birnavirus patógeno de *Drosophila melanogaster* (Zambon y col. 2006). Sin embargo, no se ha caracterizado el mecanismo empleado por este virus para contrarrestar este mecanismo de defensa antiviral. En el presente trabajo se muestra la primera evidencia de que la proteína VP3 del virus DXV posee la capacidad de suprimir el silenciamiento génico, lo que sugiere que podría jugar una función importante controlando la maquinaria de silenciamiento de su hospedador. De forma similar, nuestros datos muestran que la proteína VP3 de IPNV, un birnavirus que infecta distintas especies de peces, también posee la capacidad de suprimir el silenciamiento. Acorde con estos datos, se ha demostrado que la proteína B2 de los alphanodavirus, la proteína supresora de silenciamiento mejor estudiada de los virus de insecto (Li y col. 2002; Chao y col. 2005; Lingel y col. 2005), posee un homólogo funcional en algunos betanodavirus que infectan peces (Iwamoto y col. 2005; Fenner y col. 2006b).

A pesar de que la secuencia aminoacídica de la VP3 codificada por los diferentes miembros de la familia *Birnaviridae* presenta un bajo nivel de conservación (Casañas y col. 2008), todas ellas presentan una similar capacidad para interacción con moléculas de dsRNA de diferentes longitudes y para contrarrestar el silenciamiento génico (Valli y col. 2012). Conjuntamente, estos resultados sugieren la posibilidad de que la supresión de silenciamiento génico es una actividad conservada entre las distintas proteínas VP3 y que el silenciamiento podría ejercer una función defensiva en las infecciones de peces y aves. De acuerdo con esta hipótesis, recientemente se ha determinado la presencia de una proteína supresora de silenciamiento codificada por el genoma del herpesvirus del pavo (*Turkey Herpesvirus*; HVT) (Jing y col. 2011).

Como ya se ha mencionado anteriormente, la expresión de proteínas supresoras de silenciamiento es una estrategia general empleada por virus de plantas para contrarrestar el silenciamiento génico, y algunos de estos virus, como el virus de la sharka (PPV) son incapaces de replicar en ausencia de una proteína supresora de silenciamiento (Carbonell y col. 2012; García-Ruíz y col. 2010). En este estudio hemos demostrado que VP3 es capaz de reemplazar a la proteína HCPro, la proteína supresora de silenciamiento de PPV, en el contexto de una infección viral en plantas, lo que demuestra su capacidad para contrarrestar las defensas del hospedador en el contexto de una infección viral. Sin embargo, es preciso hacer notar que, a pesar de que la actividad de las proteínas VP3 y HCPro de PPV, expresadas a partir de la poliproteína de PPV, son similares en los ensayos de agroinfiltración, la eficiencia infectiva del virus quimera PPV-VP3 fue inferior a la observada con el virus PPV silvestre, siendo las plantas infectadas con el virus PPV-VP3 capaces de recuperarse de la infección. Estos resultados concuerdan con observaciones recientes obtenidas con virus quimera de PPV que expresan diferentes proteínas supresoras de silenciamiento (Maliogka y col. 2012), lo que refuerza la idea de que la capacidad de una proteína supresora de silenciamiento para reemplazar a HCPro en una infección viral no depende exclusivamente de la fortaleza del supresor empleado sino que también implica otros mecanismos moleculares específicos en la interacción huésped-patógeno, que contribuyen a la máxima eficacia del silenciamiento génico.

Carecemos por el momento de evidencias concluyentes que demuestren que el silenciamiento génico opera como mecanismo antiviral en vertebrados. Sin embargo, la disponibilidad de tecnologías de secuenciación masiva ha permitido recientemente la identificación de siRNAs en gran variedad de virus RNA que infectan mamíferos; así como la asociación de estos siRNAs con complejos efectores del silenciamiento (Parameswaran y col. 2010; Schopman y col. 2012). Estas observaciones, junto con la demostración de que muchos virus RNA que infectan mamíferos codifican proteínas supresoras del silenciamiento génico (Bivalkar-Mehla y col. 2011; Maliogka y col. 2012), sugieren que este mecanismo podría estar hasta cierto punto implicado en la defensa de los vertebrados frente a virus RNA. A este respecto, es importante destacar que la relación existente entre el silenciamiento y los virus puede ser multifacética en estos organismos: además del efecto directo de los siRNAs derivados de la infección, algunas de estas moléculas pequeñas son capaces de interaccionar con genes del hospedador involucrados en la defensa antiviral (Gupta y col. 2006; Gottwein y col. 2007). Adicionalmente, se ha descrito que algunos microRNAs (miRNAs) del hospedador contribuyen en la resistencia frente a virus (Lecellier y col. 2005; Huang y col. 2007; Otsuka y col. 2007; Pedersen y col. 2007; Song y col. 2010; Van Stry y col. 2012), mientras que otros son esenciales para la replicación viral (Jopling y col. 2005).

En este intrincado escenario se espera que la contribución de las proteínas supresoras de silenciamiento esté estrictamente regulada. Se ha descrito que algunas proteínas supresoras de silenciamiento génico de virus que infectan a mamíferos participan también en la defensa frente a otras respuestas antivirales del hospedador, como el sistema del interferón, posiblemente gracias a su interacción con el dsRNA, lo que añade otro nivel de complejidad a la actividad de estas proteínas (Lichner y col. 2003; Zhu y col. 2012). Por ejemplo, las proteínas de unión a dsRNA E3 de VACV y NS1 del virus de la gripe inhiben la respuesta innata antiviral regulada por el interferón y actúan como supresoras de silenciamiento génico (Li y col. 2004). En concreto, se ha demostrado que el motivo de unión a dsRNA de la proteína NS1, implicado en la supresión de la inmunidad innata, es también esencial para la supresión del silenciamiento (Li y col. 2003). Diversos trabajos han descrito la interrelación existente entre el silenciamiento génico y la defensa dependiente del interferón. Así, la

transfección de siRNAs a distintas líneas celulares provoca la activación de PKR (Sledz y col. 2003). Por otra parte, se ha observado que el interferón puede inducir la expresión de numerosos miRNAs celulares con secuencias complementarias al RNA genómico del virus de la hepatitis C (HCV) (Pedersen y col. 2007). En consecuencia, la capacidad de interacción con dsRNAs de las proteínas supresoras de silenciamiento podría contribuir a la interferencia con los dos sistemas de defensa, el mediado por interferón y el promovido por el silenciamiento génico (Li y col. 2004). En este momento no es descartable, por tanto, la posibilidad de que, además de modular otros mecanismos de defensa inducidos por dsRNA, la proteína VP3 contribuya a la inhibición de procesos de silenciamiento en células infectadas por IBDV.

5.4. Análisis del motivo de unión al dsRNA de VP3 mediante Resonancia de Plasmón de Superficie (SPR)

Un objetivo central de nuestro proyecto consistía en profundizar en la caracterización del proceso de formación de los complejos VP3-dsRNA. Para ello, decidimos emplear biosensores basados en el fenómeno SPR que permiten caracterizar interacciones biomoleculares en tiempo real y proporcionan información muy precisa sobre estos procesos (McDonnell 2001; Rich y Myszka 2002).

En el presente trabajo hemos determinado que la interacción entre la proteína VP3 y el dsRNA presenta una constante de velocidad de asociación (k_a) de $2.95 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y una velocidad media de disociación (k_d) de $1.4 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, lo que resulta en una constante de afinidad aparente al equilibrio (K_D), calculada a partir de las constantes cinéticas, k_a y k_d , de $4.75 \times 10^{-9} \text{ M}$. La referencia al término constante de afinidad aparente al equilibrio es necesaria dado que desconocemos aspectos fundamentales acerca como se produce la interacción. Por un lado, desconocemos la secuencia concreta del dsRNA a la que se une la proteína y por otro, carecemos de información acerca de si la proteína interacciona únicamente como dímero o si, por el contrario, forma oligómeros en la superficie del dsRNA. Por tanto, las curvas obtenidas corresponden a un promedio del aumento de masa detectado en la superficie de la celdilla de análisis. Los datos obtenidos se ajustaron al modelo de interacción 1:1 de

Langmuir (Myszka 2000), introduciendo una corrección para la deficiencia en el transporte de masas, considerando al analito VP3 como un dímero con un único sitio de unión al dsRNA.

Nuestros resultados indican que la disminución de la longitud del ligando (dsRNA) ocasiona una fuerte reducción de la señal obtenida. En un primer análisis, la afinidad calculada para la formación del complejo VP3 con un ligando dsRNA biotinilado de una longitud de 16 nt ($K_D = 2.44 \times 10^{-8} \text{M}$) es 20 veces inferior a la determinada para el ligando de 24 nt ($K_D = 4.75 \times 10^{-9} \text{M}$) mientras que no se observó señal detectable cuando se empleó un ligando similar con una longitud de 8 nucleótidos. Un análisis más profundo, realizada mediante la hibridación de analitos de cadena sencilla con distintas longitudes (21, 19, 17, 15, 13, 11 y 9 nt) a moléculas de RNA de cadena sencilla de 24 nt unidos a la superficie de la celda de análisis, permitió observar que la formación del complejo presenta diferencias significativas en función del tamaño del dúplex de dsRNA empleado. Aunque se observó señal de interacción con todos los analitos utilizados, el nivel de interacción detectado se reduce al disminuir el tamaño del dúplex RNA disponible para la interacción. Esta disminución no es lineal, lo que sugiere la posibilidad de que uno o varios dímeros de VP3 estén interaccionando con el analito dependiendo de su longitud. Mediante este ensayo se determinó que el tamaño mínimo de dúplex de RNA para que se produzca la interacción es de 9 nt.

De forma global, los resultados del análisis mediante SPR han corroborado los datos obtenidos mediante EMSA, no detectándose señal de asociación por parte de la versión mutante VP3Patch1 con el dsRNA y observándose una reducción significativa en la señal de asociación obtenida con la proteína VP3Patch2, indicando que esta última presenta una afinidad muy inferior a la de la proteína nativa VP3.

El empleo de versiones de la proteína VP3 con mutaciones puntuales de sustitución de los residuos básicos de la región Patch1 nos permitió determinar que los residuos K99 y K106 son necesarios e imprescindibles para que se produzca la interacción, mientras que la sustitución de los otros dos residuos básicos (R102 o K105) presentes en esta región no altera la capacidad de interacción aunque esta se ve

reducida. Estos datos fueron comprobados experimentalmente mediante el análisis de la capacidad de interacción de mutantes dobles de sustitución, mostrando que únicamente la versión mutante de VP3 que mantenía los residuos K99 y K106 es capaz de interaccionar con el dsRNA.

5.5. Modelos de interacción de VP3 con moléculas dsRNA de distintas longitudes

El estudio topológico de la proteína VP3 y el dsRNA de 21 nt nos ha permitido proponer un modelo de interacción VP3-dsRNA que explicaría la interacción detectada mediante los ensayos bioquímicos descritos anteriormente. En la figura 28 se muestran las estructuras cristalográficas del dímero VP3 y de una molécula siRNA de 21 nucleótidos.

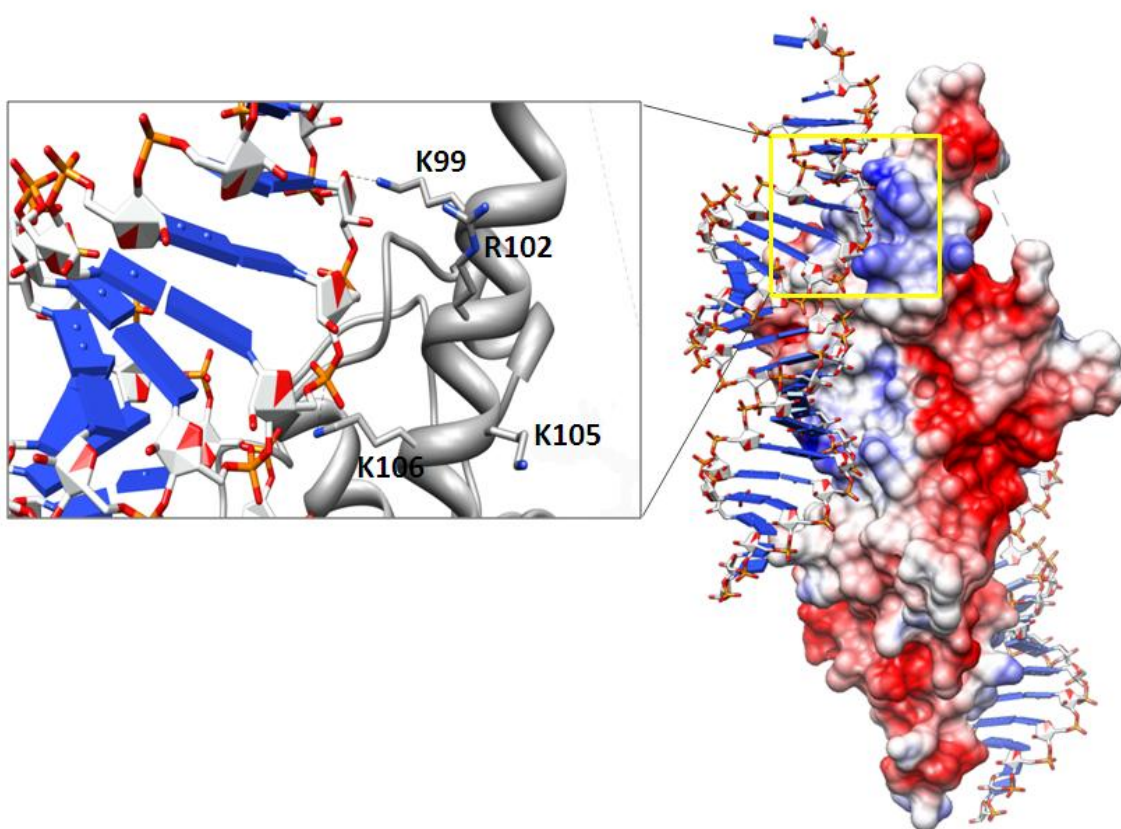


Figura 28. Modelo de interacción VP3-21ntsiRNA. Se realizó un ajuste basado en el estudio topológico de la estructura del dímero VP3 y la estructura de un dúplex RNA de 21 nucleótidos. El recuadro amarillo muestra las regiones de contacto principales entre el dímero VP3 y el dsRNA ampliadas en el recuadro gris.

Encontramos que el mejor ajuste para la interacción entre estas dos moléculas confirma nuestras observaciones bioquímicas dado que los residuos K99 y K106 se encuentran más próximos al dsRNA que los residuos R102 y K105, indicando que los primeros serían los residuos críticos para el establecimiento de la interacción. Así mismo, el hecho de que la versión mutante VP3Patch2 muestre una señal de asociación con el dsRNA muy inferior a la observada con la proteína VP3 silvestre y que la versión mutante VP3Patch1 sea incapaz de interaccionar, nos ha llevado a proponer una posible hipótesis para explicar cómo ocurriría la interacción de la proteína VP3 con el dsRNA genómico de IBDV (Figura 29).

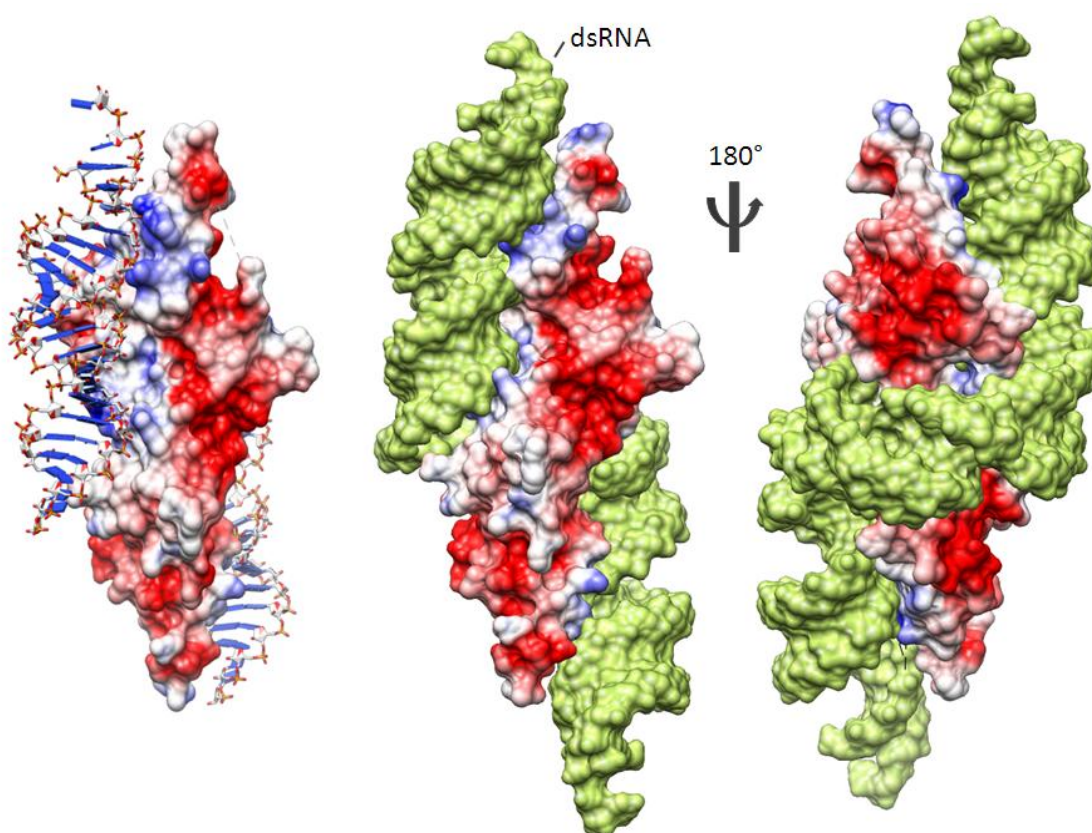


Figura 29. Modelo de interacción VP3-dsRNA genómico. Se muestra un ajuste probable entre el dímero VP3 y una molécula larga de dsRNA (verde).

Las observaciones realizadas sugieren la posibilidad de que la interacción se produzca a través de la región Patch1. En este modelo, la región Patch2 tendría una función de anclaje, permitiendo un ligero giro en la molécula de dsRNA para alcanzar la región Patch1, localizada de forma simétrica al otro extremo del dímero VP3. De esta

forma, las moléculas de dsRNA se encontrarían prácticamente extendidas sufriendo únicamente una leve compresión, una disposición opuesta a la observada para las histonas y el DNA celular (Kornberg 1977), tal y como se ha descrito en estudios previos del laboratorio (Luque y col. 2009). Es importante reseñar que la resolución de la estructura cristalográfica de las regiones N- y C-terminal de la proteína VP3 podría dar lugar a modificaciones significativas en el modelo propuesto.

6 CONCLUSIONES

1. El bloqueo de la síntesis proteica y la respuesta apoptotica inducida por la expresión del gen VP2 de IBDV en células HeLa son precedidos por la fosforilación de PKR y del factor de iniciación de la traducción eIF2 α .
2. La expresión de VP3 previene el bloqueo de la síntesis proteica y la respuesta apoptotica inducida por la expresión de VP2, inhibiendo la activación de PKR, la subsecuente fosforilación de eIF2 α y la activación de la cascada apoptotica.
3. La proteína VP3 de IBDV es capaz de reemplazar funcionalmente al polipéptido E3 de VACV y sugiere que VP3 podría ejercer una función similar a E3 en células infectadas por IBDV contrarrestando la respuesta innata antiviral del hospedador.
4. Las proteínas VP3 de los birnavirus IBDV, IPNV y DXV protegen el mRNA de la GFP de la degradación mediada por el silenciamiento génico en un sistema heterólogo de plantas, posiblemente mediante un modo de acción dual que bloquearía tanto el procesamiento de las moléculas largas de dsRNA y la producción de siRNAs por parte de Dicer, como la incorporación de los siRNAs al complejo efector RISC. Estos resultados sugieren la posibilidad de que la supresión de silenciamiento génico es una actividad conservada entre las distintas proteínas VP3 y que el silenciamiento podría ejercer una función defensiva no sólo en las infecciones de insectos, sino también en las de peces y aves.
5. La proteína VP3 de IBDV es capaz de reemplazar a la proteína HCPro, la proteína supresora de silenciamiento de PPV, en el contexto de una infección viral en plantas, lo que demuestra su capacidad para contrarrestar las defensas del hospedador en el contexto de una infección viral.
6. Las mutaciones en el motivo Patch1 de la proteína VP3 destruyen completamente la capacidad de unión al dsRNA de VP3 así como su capacidad de inhibir la apoptosis mediada por PKR y de suprimir el silenciamiento génico. Sin embargo, las mutaciones en el motivo Patch2 reducen la capacidad de unión al dsRNA de VP3 pero no destruyen su actividad antiapoptótica ni anti-silenciadora.

7. Mediante el análisis SPR se ha determinado que los residuos K99 y K106 del motivo Patch1 son imprescindibles para que ocurra la interacción VP3-dsRNA y que el tamaño mínimo de dúplex de RNA para que se produzca la interacción es de 9 nt.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Ahlquist P.** 2002. RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. *Science*. **296**: 1270-3.
- Ahlquist P.** 2006. Parallels among positive-strand RNA viruses, reverse-transcribing viruses and double-stranded RNA viruses. *Nat Rev*. **4**: 371-82.
- Anandalakshmi R, Pruss GJ, Ge X, Marathe R, Mallory AC, Smith TH y Vance VB.** 1998. A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*. **95**: 13079-84.
- Antin PB y Ordahl CP.** 1991. Isolation and characterization of an avian myogenic cell line. *Dev Biol*. **143**: 111-121.
- Baglioni C, Maroney PA y West DK.** 1979. 2'5'Oligo(A) polymerase activity and inhibition of viral RNA synthesis in interferon-treated HeLa cells. *Biochemistry*. **18**: 1765-70.
- Baulcombe DC.** 2006. Short silencing RNA: the dark matter of genetics?. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. **71**: 13-20.
- Beattie E, Kauffman EB, Martínez H, Perkus ME, Jacobs BL, Paoletti E y Tartaglia J.** 1996. Host-range restriction of vaccinia virus E3L-specific deletion mutants. *Virus Genes*. **12**: 89-94.
- Beattie E, Tartaglia J y Paoletti E.** 1991. Vaccinia virus-encoded eIF-2 alpha homolog abrogates the antiviral effect of interferón. *Virology*. **183**: 419-22.
- Becht, H.** 1980. Infectious bursal disease virus. *Curr Top Microbiol Immunol*. **90**: 107-121.
- Bennasser Y, Le SY, Benkirane M y Jeang KT.** 2005. Evidence that HIV-1 encodes an siRNA and a suppressor of RNA silencing. *Immunity*. **22**: 607-619.
- Bivalkar-Mehla S, Vakharia J, Mehla R, Abreha M, Kanwar JR, Tikoo A y Chauhan A.** 2011. Viral RNA silencing suppressors (RSS): novel strategy of viruses to ablate the host RNA interference (RNAi) defense system. *Virus Res*. **155**: 1-9.
- Blake SL, Schill WB, McAllister PE, Lee MK, Singer JT y Nicholson BL.** 1995. Detection and identification of aquatic birnaviruses by PCR assay. *J Clin Microbiol*. **33**: 835-9.
- Blair CD.** 2011. Mosquito RNAi is the major innate immune pathway controlling arbovirus infection and transmission. *Future Microbiol*. **6**: 265-277.
- Böttcher B, Kiselev NA, Stel'Mashchuk VY, Perevozchikova NA, Borisov AV y Crowther RA.** 1997. Three-dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy. *J Virol*. **71**: 325-30.

Brandt TA y Jacobs BI. 2001. Both Carboxy- and Amino-Terminal Domains of the Vaccinia Virus Interferon Resistance Gene, E3L, Are Required for Pathogenesis in a Mouse Model. *J Virol.* **75**: 850-6.

Brandt M, Yao K, Liu M, Heckert RA y Vakharia VN. 2001. Molecular determinants of virulence, cell tropism, and pathogenic phenotype of infectious bursal disease virus. *J Virol.* **75**: 11974-11982.

Bridge AJ, Pebernard S, Ducraux A, Nicoulaz AL y Iggo R. 2003. Induction of an interferón response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet.* **34**: 263-264.

Brigneti G, Voinnet O, Li WX, Ji LH, Ding SW y Baulcombe DC. 1998. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J.* **17**: 6739-46.

Bucher E, Hemmes H, de Haan P, Goldbach R y Prins M. 2004. The influenza A virus NS1 protein binds small interfering RNAs and suppresses RNA silencing in plants. *J Gen Virol.* **85**: 983-991.

Burkhardt E y Müller H. 1987. Susceptibility of chicken blood lymphoblasts and monocytes to infectious bursal disease virus (IBDV). *Arch Virol.* **94**: 297-303.

Carbonell A, Dujovny G, García JA y Valli A. 2012. The *Cucumber vein yellowing virus* silencing suppressor P1b can functionally replace HCPro in Plum pox virus infection in a host-specific manner. *Mol Plant-Microbe Interact.* **25**: 151-164.

Carthew RW y Sontheimer EJ. 2009. Origins and mechanism of miRNAs and siRNAs. *Cell.* **136**: 642-655.

Carroll K, Elroy-Stein O, Moss B y Jagus R. 1993. Recombinant vaccinia virus K3L gene product prevents activation of double-stranded RNA-dependentn, initiation factor 2a-specific protein kinase. *J Biol Chem.* **268**: 12837-42.

Casañas A, Navarro A, Ferrer-Orta C, González D, Rodríguez JF y Verdaguer N. 2008. Structural insights into the multifunctional protein VP3 of birnaviruses. *Structure.* **16**: 29-37.

Castón JR, Martínez-Torrecuadrada JL, Maraver A, Lombardo E, Rodríguez JF, Casal JI y Carrascosa JL. 2001. C terminus of infectious bursal disease virus major capsid protein VP2 is involved in definition of the T number for capsid assembly. *J Virol.* **75**: 10815-10828.

Castón JR, Rodríguez JF y Carrascosa JL. 2008. Infectious Bursal Disease Virus: A Segmented Double-Stranded RNA Virus With a T = 13 Capsid that Lacks a T = 1 Core. *Segmented Double-Stranded RNA Viruses: Structure and Molecular Biology.* Patton, JT. Bethesda, USA, Caister Academic Press.

- Cerutti H y Casas-Mollano JA.** 2006. On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. *Curr Genet.* **50**: 81-99.
- Chang HW, Uribe LH y Jacobs BL.** 1995. Rescue of vaccinia virus lacking the E3L gene by mutants of E3L. *J Virol.* **69**: 6605-8.
- Chang HW, Watson JC y Jacobs BL.** 1992. The E3L gene of vaccinia virus encodes an inhibitor of the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA.* **89**: 4825-9.
- Chao JA, Lee JH, Chapados BR, Debler EW, Schneemann A y Williamson JR.** 2005. Dual modes of RNA-silencing suppression by Flock House virus protein B2. *Nat Struct Mol Biol.* **12**: 952-7.
- Chevalier C, Galloux M, Pous J, Henry C, Denis J, Da Costa B, Navaza J, Lepault J y Delmas B.** 2005. Structural peptides of a nonenveloped virus are involved in assembly and membrane translocation. *J Virol.* **79**: 12253-12263.
- Chevalier C, Lepault J, Erk I, Da Costa B y Delmas B.** 2002. The maturation process of pVP2 requires assembly of infectious bursal disease virus capsids. *J Virol.* **76**: 2384-92.
- Cheville NF.** 1967. Studies on the pathogenesis of Gumboro disease in the bursa of Fabricius, spleen, and thymus of the chicken. *Am J Pathol.* **51**: 527-51.
- Chowdhury I, Tharakan B y Bhat GK.** 2006. Current concepts in apoptosis: the physiological suicide program revisited. *Cell Mol Biol Lett.* **11**: 506-25.
- Clem RJ y Miller LK.** 1994. Control of Programmed Cell Death by the Baculovirus Genes p35 and iap. *Mol Cell Biol.* **14**: 5212-5222.
- Coulibaly F, Chevalier C, Gutsche I, Pous J, Navaza J, Bressanelli S, Delmas B y Rey FA.** 2005. The birnavirus crystal structure reveals structural relationships among icosahedral viruses. *Cell.* **120**: 761-772.
- Csorba T, Pantaleo V y Burgyán J.** 2009. RNA silencing: an antiviral mechanism. *Adv Virus Res.* **75**: 35-71.
- Curtis MD y Grossniklaus U.** 2003. A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol.* **133**: 462-469.
- Da Costa B, Chevalier C, Henry C, Huet JC, Petit S, Lepault J, Boot H y Delmas B.** 2002. The capsid of infectious bursal disease virus contains several small peptides arising from the maturation process of pVP2. *J Virol.* **76**: 2393-402.

Delgadillo MO, Sáenz P, Salvador B, García JA y Simón-Mateo C. 2004. Human influenza virus NS1 protein enhances viral pathogenicity and acts as an RNA silencing suppressor in plants. *J Gen Virol.* **85**: 993-999.

Di Nicola-Negri E, Brunetti A, Tavazza M y Llardi V. 2005. Hairpin RNA-mediated silencing of Plum pox virus P1 and HC-Pro genes for efficient and predictable resistance to the virus. *Transgenic Res.* **14**: 989-94.

Díaz-Pendón JA y Ding SW. 2008. Direct and indirect roles of viral suppressors of RNA silencing in pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol.* **46**: 303-326.

Dobos P. 1993. In vitro guanylation of infectious pancreatic necrosis virus polypeptide VP1. *Virology.* **193**: 403-413.

Dobos P, Hill BJ, Hallett R, Kells DTC, Becht H y Teninges D. 1979. Biophysical and Biochemical Characterization of Five Animal Viruses with Bisegmented Double-Stranded RNA Genomes. *J Virol.* **32**: 593-605.

Dulbecco R y Freeman G. 1959. Plaque production by the polyoma virus. *Virology.* **8**: 396-397.

Duriez PJ y Shah GM. 1997. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: a sensitive parameter to study cell death. *Biochem Cell Biol.* **75**(4): 337-49.

Ernst V, Levin DH y London IM. 1979. In situ phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2 in reticulocyte lysates inhibited by heme deficiency, double-stranded RNA, oxidized glutathione, or the heme-regulated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA.* **76**(5): 2118-22.

Fabozzi G, Nabel CS, Dolan MA y Sullivan NJ. 2011. Ebolavirus proteins suppress the effects of small interfering RNA by direct interaction with the mammalian RNA interference pathway. *J Virol.* **85**: 2512-2523.

Farrel PJ, Balkow K, Hunt T, Jackson RJ y Trachsel H. 1977. Phosphorylation of initiation factor eIF-2 and the control of reticulocyte protein synthesis. *Cell.* **11**: 187-200.

Fenner BJ, Goh W y Kwang J. 2006a. Sequestration and protection of double-stranded RNA by the betanodavirus B2 protein. *J Virol.* **80**: 6822-6833.

Fenner BJ, Thiagarajan R, Chua HK y Kwang J. 2006b. Betanodavirus B2 is an RNA interference antagonist that facilitates intracellular viral RNA accumulation. *J Virol.* **80**: 85-94.

Fernández-Arias A, Martínez S y Rodríguez JF. 1997. The major antigenic protein of infectious bursal disease virus, VP2, is an apoptotic inducer. *J Virol.* **71**: 8014-8.

Fernández-Arias A, Risco C, Martínez S, Albar JP y Rodríguez JF. 1998. Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *J Gen Virol.* **79**: 1047-54.

Festjens N, Cornelis S, Lamkanfi M y Vandenabeele P. 2006. Caspase-containing complexes in the regulation of cell death and inflammation. *Biol Chem.* **387**: 1005-16.

Floyd-Smith G, Slattery E y Lengyel P. 1981. Interferon action: RNA cleavage pattern of a (2'-5')oligoadenylate-dependent endonuclease. *Science.* **212**: 1030-2.

Galloux M, Libersou S, Morellet N, Bouaziz S, Da Costa B, Ouldali M, Lepault J y Delmas B. 2007. Infectious bursal disease virus, a non-enveloped virus, possesses a capsid-associated peptide that deforms and perforates biological membranes. *J Biol Chem.* **282**: 20774-84.

García-Ruiz H, Takeda A, Chapman EJ, Sullivan CM, Fahlgren N, Brempelis KJ y Carrington JC. 2010. Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerases and dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during Turnip Mosaic Virus infection. *Plant Cell.* **22**: 481-96.

Gardner H, Kerry K, Riddle M, Brouwer S y Gleeson L. 1997. Poultry virus infection in Antarctic penguins. *Nature.* **387**(6630): 245.

Garriga D, Navarro A, Querol-Audí J, Abaitua F, Rodríguez JF y Verdaguer N. 2007. Activation mechanism of a noncanonical RNA-dependent RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA.* **104**: 20540-20545.

Geng X, Harry BL, Zhou Q, Skeen-Gaar RR, Ge X, Lee ES, Mitani S y Xue D. 2012. Hepatitis B virus X protein targets the Bcl-2 protein CED-9 to induce intracellular Ca²⁺ increase and cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **109**: 18465-70.

Gherardi MM, Ramirez JC, Rodríguez D, Rodríguez JR, Sano G, Zavala F y Esteban M. 1999. IL-12 delivery from recombinant vaccinia virus attenuates the vector and enhances the cellular immune response against HIV-1 Env in a dose-dependent manner. *J Immunol.* **162**: 6724-33.

Ghildiyal M y Zamore PD. 2009. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature Rev Genet.* **10**: 94-108.

Gitlin L y Andino R. 2003. Nucleic acid-based immune system: the antiviral potential of mammalian RNA silencing. *J Virol.* **77**: 7159-65.

González-López C, Martínez-Costas J, Esteban M y Benavente J. 2003. Evidence that avian reovirus sigmaA protein is an inhibitor of the double-stranded RNA-dependent protein kinase. *J Gen Virol.* **84**: 1629-39.

Gottwein E, Mukherjee N, Sachse C, Grenzel C, Majoros WH, Chi JT, Braich R, Manoharan M, Soutschek J, Ohler U y Cullen BR. 2007. A viral microRNA functions as an orthologue of cellular miR-155. *Nature*. **450**: 1096-9.

Guerra S, Abaitua F, Martínez-Sobrido L, Esteban M, García-Sastre A y Rodríguez D. 2011. Host-range restriction of vaccinia virus E3L deletion mutant can be overcome in vitro, but not in vivo, by expression of the influenza virus NS1 protein. *PLoS One*. **6**: e28677.

Gupta A, Gartner JJ, Sethupathy P, Hatzigeorgiou AG y Fraser NW. 2006. Anti-apoptotic function of a microRNA encoded by the HSV-1 latency-associated transcript. *Nature*. **442**: 82-85.

Haga IR y Bowie AG. 2005. Evasion of innate immunity by vaccinia virus. *Parasitology*. **130**: 11-25.

Hammond SM, Bernstein E, Beach D y Hannon GJ. 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*. **404**: 293-6.

Han YH, Luo YJ, Wu Q, Jovel J, Wang XH, Aliyari R, Han C, Li WX y Ding SW. 2011. RNA-based immunity terminates viral infection in adult *Drosophila* in the absence of viral suppression of RNA interference: characterization of viral small interfering RNA populations in wild-type and mutant flies. *J Virol*. **85**: 13153-63.

Heljasvaara R, Rodríguez D, Risco C, Carrascosa JL, Esteban M y Rodríguez JR. 2001. The major core protein P4a (A10L gene) of vaccinia virus is essential for correct assembly of viral DNA into the nucleoprotein complex to form immature viral particles. *J Virol*. **75**: 5778-95.

Hemmes H, Lakatos L, Goldbach R, Burgyan J, y Prins M. 2007. The NS3 protein of *Rice hoja blanca tenuivirus* suppresses RNA silencing in plant and insect hosts by efficiently binding both siRNAs and miRNAs. *RNA*. **13**: 1079-1089.

Henderson S, Rowe M, Gregory C, Croom-Carter D, Wang F, Longnecker R, Kieff E y Rickinson A. 1991. Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell*. **65**: 1107-1115.

Hengartner MO. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. **407**: 770-776.

Hjalmarsson A, Carlemalm E y Everitt E. 1999. Infectious pancreatic necrosis virus: identification of a VP3-containing ribonucleoprotein core structure and evidence for O-linked glycosylation of the capsid protein VP2. *J Virol*. **73**: 3484-90.

Huang J, Wang F, Argyris E, Chen K, Liang Z, Tian H, Huang W, Squires K, Verlinghieri G y Zhang H. 2007. Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4+ T lymphocytes. *Nat Med.* **13**: 1241-7.

Huismans H y Joklik WK. 1976. Reovirus-coded polypeptides in infected cells: isolation of two native monomeric polypeptides with affinity for single-stranded and double-stranded RNA, respectively. *Virology.* **70**: 411-24.

Iwamoto T, Mise K, Takeda A, Okinaka Y, Mori K, Arimoto M, Okuno T y Nakai T. 2005. Characterization of Striped jack nervous necrosis virus subgenomic RNA3 and biological activities of its encoded protein B2. *J Gen Virol.* **86**: 2807-16.

Jacobs BL y Langland JO. 1996. When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA. *Virology.* **219**: 339-49.

Jing XL, Fan MN, Jia G, Liu LW, Ma L, Zheng CC, Zhu XP, Liu HM y Wang XY. 2011. A multifunctional protein encoded by turkey herpesvirus suppresses RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. *J Virol.* **85**: 12792-803.

Jopling CL, Yi MK, Lancaster AM, Lemon SM y Sarnow P. 2005. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific microRNA. *Science.* **309**: 1577-1581.

Jungmann A, Nieper H y Müller H. 2001. Apoptosis is induced by infectious bursal disease virus replication in productively infected cells as well as in antigen-negative cells in their vicinity. *J Gen Virol.* **82**: 1107-15.

Juo P, Kuo CJ, Yuan J y Blenis J. 1998. Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr Biol.* **8**: 1001-8.

Kaplan C. 1989. Vaccinia virus: a suitable vehicle for recombinant vaccines?. *Arch Virol.* **106**: 127-39.

Karjee S, Minhas A, Sood V, Ponia SS, Banerjea AC, Chow VT, Mukherjee SK y Lal SK. 2011. The 7a accessory protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus acts as an RNA silencing suppressor. *J Virol.* **84**: 10395-401.

Kasschau KD y Carrington JC. 1998. A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell.* **95**: 461-70.

Kaufer I y Weiss E. 1980. Significance of bursa of Fabricius as target organ in infectious bursal disease of chickens. *Infect Immun.* **27**: 364-367.

Kaufman RJ. 2000. The double-stranded RNA-activated protein kinase PKR. En Sonenberg N, Hershey JWB y Mathews MB (eds), *Translational Control of Gene Expression*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 503-28.

Kepp O, Senovilla L, Galluzzi L, Panaretakis T, Tesniere A, Schlemmer F, Madeo F, Zitvogel L y Kroemer G. 2009. Viral subversión of immunogenic cell death. *Cell Cycle*. **8**: 860-9.

Kerr IM y Brown RE. 1978. pppA2'p5'A2'p5'A: an inhibitor of protein synthesis synthesized with an enzyme fraction from interferon-treated cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. **75**: 256-60.

Kibenge FS, Qian B, Cleghorn JR y Martin CK. 1997. Infectious bursal disease virus polyprotein processing does not involve cellular proteases. *Arch Virol*. **142**: 2401-19.

Kochan G, González D y Rodríguez JF. 2003. Characterization of the RNA-binding activity of VP3, a major structural protein of Infectious bursal disease virus. *Arch Virol*. **148**: 723-44.

Kornberg RD. 1977. Structure of chromatin. *Annu Rev Biochem*. **46**: 931-54.

Kumar A, Haque J, Lacoste J, Hiscott J y Williams BR. 1994. Double-stranded RNA-dependent protein kinase activates transcription factor NF-kappaB by phosphorylating I kappa B. *Proc Natl Acad Sci USA*. **91**: 6288-92.

Lagrimini LM, Bradford S y Rothstein S. 1990. Peroxidase-induced wilting in transgenic tobacco plants. *Plant Cell*. **2**: 7-18.

Lakatos L, Csorba T, Pantaleo V, Chapman EJ, Carrington JC, Liu YP, Dolja W, Calvino LF, López-Moya JJ y Burgyán J. 2006. Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J*. **25**: 2768-80.

Langland JO, Pettiford S, Jiang B y Jacobs BL. 1994. Products of the porcine group C rotavirus NSP3 gene binds specifically to double-stranded RNA and inhibits activation of the interferon-induced protein kinase PKR. *J Virol*. **68**: 3821-9.

Lawton JA, Estes MK y Prasad BV. 1997. Three-dimensional visualization of mRNA release from actively transcribing rotavirus particles. *Nat Struct Biol*. **4**: 118-121.

Lawton JA, Estes MK y Prasad BV. 2000. Mechanism of genome transcription in segmented dsRNA viruses. *Adv Virus Res*. **55**: 185-229.

Lecellier CH, Dunoyer P, Arar K, Lehmann-Che J, Eyquem S, Himber C, Saïb A y Voinnet O. 2005. A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. *Science*. **308**: 557-60.

Lee SB y Esteban M. 1993. The interferón-induced double-stranded RNA-activated human p68 protein kinase inhibits the replication of vaccinia virus. *Virology*. **193**: 1037-41.

- Lee TG, Tomita J, Hovanessian AG y Katze MG.** 1990. Purification and partial characterization of a cellular inhibitor of the interferon-induced protein kinase of Mr 68,000 from influenza virus-infected cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* **87**: 6208-12.
- Li H, Li WX y Ding SW.** 2002. Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. *Science.* **296**: 1319-21.
- Li HW y Ding SW.** 2005. Antiviral silencing in animals. *FEBS Lett.* **579**: 5965-5973.
- Li WX, Li H, Lu R, Li F, Dus M, Atkinson P, Brydon EW, Johnson KL, García-Sastre A, Ball LA, Palese P y Ding SW.** 2004. Interferon antagonist proteins of influenza and vaccinia viruses are suppressors of RNA silencing. *Proc Natl Acad Sci USA.* **101**: 1350-5.
- Li Z, Wang Y, Xue Y, Li X, Cao H y Zheng SJ.** 2012. Critical role for voltage-dependent anion channel 2 in infectious bursal disease virus-induced apoptosis in host cells vis interaction with VP5. *J Virol.* **86**: 1328-38.
- Lichner Z, Silhavy D y Burgyán J.** 2003. Double-stranded RNA-binding proteins could suppress RNA interference-mediated antiviral defences. *J Gen Virol.* **84**: 975-980.
- Lingel A, Simon B, Izaurralde E y Satter M.** 2005. The structure of the flock house virus B2 protein, a viral suppressor of RNA interference, shows a novel mode of double-stranded RNA recognition. *EMBO Rep.* **6**: 1149-1155.
- Liu M y Vakharia VN.** 2006. Nonstructural protein of infectious bursal disease virus inhibits apoptosis at the early stage of virus infection. *J Virol.* **80**: 3369-77.
- Lombardo E, Maraver A, Castón JR, Rivera J, Fernández-Arias A, Serrano A, Carrascosa JL y Rodríguez JF.** 1999. VP1, the Putative RNA-Dependent RNA Polymerase of Infectious Bursal Disease Virus, Forms Complexes with the Capsid Protein VP3, Leading to Efficient Encapsidation into Virus-Like Particles. *J Virol.* **73**: 6973-6983.
- Lombardo E, Maraver A, Espinosa I, Fernández-Arias A y Rodríguez JF.** 2000. VP5, the nonstructural polypeptide of infectious bursal disease virus, accumulates within the host plasma membrane and induces cell lysis. *Virology.* **277**: 345-57.
- Luckow VA, Lee SC, Barry GF y Olins PO.** 1993. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J Virol.* **67**: 4566-4579.
- Luque D, Rivas G, Alfonso C, Carrascosa JL, Rodríguez JF y Castón JF.** 2009. Infectious bursal disease virus is an icosahedral polypliod dsRNA virus. *Proc Natl Acad Sci USA.* **106**: 2148-2152.

Luque D, Saugar I, Rejas MT, Carrascosa JL, Rodríguez JF y Castón JR. 2009. Infectious Bursal disease virus: ribonucleoprotein complexes of a double-stranded RNA virus. *J Mol Biol.* **386**: 891-901.

Maia IG, Haenni A y Bernardi F. 1996. Potyviral HC-Pro: a multifunctional protein. *J Gen Virol.* **77**: 1335-41.

Maliogka V, Calvo M, Carbonell AT, García JA y Valli A. 2012. Heterologous RNA silencing suppressors from both plant- and animal-infecting viruses support Plum pox virus infection. *J Gen Virol.* **93**: 1601-1611.

Maraver A, Clemente R, Rodríguez JF y Lombardo E. 2003a. Identification and molecular characterization of the RNA polymerase-binding motif of infectious bursal disease virus inner capsid protein VP3. *J Virol.* **77**: 2459-2468.

Maraver A, Oña A, Abaitua F, González D, Clemente R, Ruíz-Díaz JA, Castón JR, Pazos F y Rodríguez JF. 2003b. The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical role in capsid assembly. *J Virol.* **77**: 6438-49.

Mattanovich D, Himmler G, Laimer M, Maiss E, Regner F, Da Camara Machado A, Hanzer V, Casper R y Katinger HW. 1989. Expression of the plum pox virus coat protein region in *Escherichia coli*. *Virus Genes.* **2**: 119-27.

Mathews MB y Shenk T. 1991. Adenovirus virus-associated RNA and translation control. *J Virol.* **65**: 5657-62.

McDonnell JM. 2001. Surface Plasmon resonance: towards an understanding of the mechanisms of biological molecular recognition. *Curr Opin Chem Biol.* **5**: 572-577.

Mérai Z, Kerényi Z, Kertész S, Magna M, Lakatos I y Silhavy D. 2006. Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *J Virol.* **80**: 5747-56.

Morgan MM, Macreadie IG, Harley VR, Hudson PJ y Azad AA. 1988. Sequence of the small double-stranded RNA genomic segment of infectious bursal disease virus and its deduced 90-kDa product. *Virology.* **163**: 240-2.

Müller H. 1986. Replication of infectious bursal disease virus in lymphoid cells. *Arch Virol.* **87**: 191-203.

Müller H y Nitschke R. 1987a. Molecular weight determination of the two segments of double-stranded RNA of infectious bursal disease virus, a member of the birnavirus group. *Med Microbiol Immunol.* **176**: 113.21.

- Müller H y Nitschke R.** 1987b. The two segments of the infectious bursal disease virus genome are circularized by a 90,000-Da protein. *Virology*. **159**: 174-77.
- Müller H, Scholtissek C y Becht H.** 1979. The Genome of Infectious Bursal Disease Virus Consists of Two Segments of Double-Stranded RNA. *J Virol*. **31**: 584-589.
- Mundt E, Köllner B y Kretzschmar D.** 1997. VP5 of infectious bursal disease virus is not essential for viral replication in cell cultura. *J Virol*. **71**: 5647-51.
- Myszka DG.** 2000. Kinetic, equilibrium, and thermodynamic analysis of macromolecular interactions with BIACORE. *Methods Enzymol*. **323**: 325-40.
- Naussbaum JM, Gunnery S y Mathews MB.** 2002. The 3'-untranslated regions of cytoskeletal muscle mRNAs inhibit translation by activating the double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR. *Nucleic Acids Res*. **30**: 1205-12.
- Negash T, al-Garib SO y Gruys E.** 2004. Comparison of in ovo and post-hatch vaccination with particular reference to infectious bursal disease. A review. *Vet Q*. **26**: 76-87.
- Novina CD y Sharp PA.** 2004. The RNAi revolution. *Nature*. **430**:161-4.
- Oña A, Luque D, Abaitua F, Maraver A, Castón JR y Rodríguez JF.** 2004. The C-terminal domain of the pVP2 precursor is essential for the interaction between VP2 and VP3, the capsid polypeptides of infectious bursal disease virus. *Virology*. **322**: 135-142.
- Otsuka M, Jing Q, Georgel P, New L, Chen J, Mols J, Kang YJ, Jiang Z, Du X, Cook R, Das SC, Pattnaik AK, Beutler B y Han J.** 2007. Hypersusceptibility to vesicular stomatitis virus infection in Dicer1-deficient mice is due to impaired miR24 and miR93 expression. *Immunity*. **27**: 123-34.
- Pan J, Vakharia VN y Tao YJ.** 2007. The structure of birnavirus polymerase reveals a distinct active site topology. *Proc Natl Acad Sci USA*. **104**: 7385-7390.
- Parameswaran P, Sklan E, Wilkins C, Burgon T, Samuel MA, Lu R, Ansel KM, Heissmeyer V, Einav S, Jackson W, Doukas T, Paranjape S, Polacek C, dos Santos FB, Jalli R, Babrzadeh F, Gharizadeh B, Grimm D, Kay M, Koike S, Sarnow P, Ronaghi M, Ding SW, Harris E, Chow M, Diamond MS, Kirkegaard K, Glenn JS y Fire AZ.** 2010. Six RNA viruses and forty-one hosts: viral small RNAs and modulation of small RNA repertoires in vertebrate and invertebrate systems. *PLoS Pathog*. **6**: e1000764.
- Patton JT, Vasquez-Del Carpio R, Tortorici MA y Taraporewala ZF.** 2007. Coupling of rotavirus genome replication and capsid assembly. *Adv Virus Res*. **69**: 167-201.

- Pedersen IM, Cheng G, Wieland S, Volinia S, Croce CM, Chisari FV y David M.** 2007. Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism. *Nature*. **449**: 919-22.
- Perdiguero B y Esteban M.** 2009. The interferón system and vaccinia virus evasión mechanisms. *J Interferon Cytokine Res*. **29**: 581-98.
- Pestka S, Langer JA, Zoon KC y Samuel CE.** 1987. *Annu Rev Biochem*. **56**: 727-77.
- Quian S, Zhong X, Yu L, Ding B, de Haan P y Boris-Lawrie K.** 2009. HIV-1 Tat RNA silencing suppressor activity is conserved across kingdoms and counteracts translational repression of HIV-1. *Proc Natl Acad Sci USA*. **106**: 605-10.
- Qiu WP, Park JW y Scholthof HB.** 2002. Tombusvirus p19-mediated suppression of virus-induced gene silencing is controlled by genetic and dosage features that influence pathogenicity. *Mol Plant-Microbe Interact*. **15**: 269-280.
- Raleigh EA, Elbing K y Brent R.** 2002. Selected Topics from Classical Bacterial Genetics. *Curr Protoc Mol Biol*. Chapter **1**: Unit 1.4.
- Reinisch KM, Nibert ML y Harrison SC.** 2000. Structure of the Reovirus core at 3.6 Å resolution. *Nature*. **422**: 216-225.
- Rich RL y Myszka DG.** 2002. Survey of the year 2001 commercial optical biosensor literature. *J Mol Recognit*. **15**: 352-376.
- Roberts LO, Jopling CL, Jackson RJ y Willis AE.** 2009. Viral strategies to subvert the mammalian translation machinery. *Prog Mol Biol Transl Sci*. **90**: 313-67.
- Rohila JS, Chen M, Cerny R y Fromm ME.** 2004. Improved tandem affinity purification tag and methods for isolation of protein heterocomplexes from plants. *Plant J*. **38**: 172-181.
- Romano PR, Zhang F, Tan SL, García-Barrio MT, Katze MG, Dever TE y Hinnebusch AG.** 1998. Inhibition of Double-Stranded RNA-Dependent Protein Kinase PKR by Vaccinia Virus E3: Role of Complex Formation and the E3 N-Terminal Domain. *Mol Cell Biol*. **18**: 7304-7316.
- Sadler AJ y Williams BRG.** 2008. Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol*. **8**: 559-568.
- Sánchez AB y Rodríguez JF.** 1999. Proteolytic processing in infectious bursal disease virus: identification of the polyprotein cleavage sites by site-directed mutagenesis. *Virology*. **262**: 190-9.

- Saugar I, Luque D, Oña A, Rodríguez JF, Carrascosa JL, Trus BL y Castón JR.** 2005. Structural polymorphism of the major capsid protein of a double-stranded RNA virus: an amphipathic alpha helix as a molecular switch. *Structure*. **13**: 1007-1017.
- Schnitzler D, Bernstein F, Muller H y Becht H.** 1993. The genetic basis for the antigenicity of the VP2 protein of the infectious bursal disease virus. *J Gen Virol*. **74**: 1563-1571.
- Schopman NC, Willemsen M, Liu YP, Bradley T, van Kampen A, Baas F, Berkhout B y Haasnoot J.** 2012. Deep sequencing of virus-infected cells reveals HIV-encoded small RNAs. *Nucleic Acids Res*. **40**: 414-27.
- Sen GC y Lengyel P.** 1992. The interferon system. A bird's eye view of its biochemistry. *J Biol Chem*. **267**: 5017-20.
- Sledz CA, Holko M, De Veer MJ, Silverman RH y Williams BR.** 2003. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol*. **5**: 834-839.
- Song L, Liu H, Gao S, Jiang W y Huang W.** 2010. Cellular microRNAs inhibit replication of the H1N1 influenza A virus in infected cells. *J Virol*. **84**: 8849-8860.
- Spies U y Muller H.** 1990. Demonstration of enzyme activities required for capsid structure formation in infectious bursal disease virus, a member of the birnavirus group. *J Gen Virol*. **71**: 977-981.
- Spies U, Müller H y Becht H.** 1987. Properties of RNA polymerase activity associated with infectious bursal disease virus and characterization of its reaction products. *Virus Res*. **8**: 127-40.
- Tan SL y Katze MG.** 1998. Biochemical and genetic evidence for complex formation between the influenza A virus NS1 protein and the interferon-induced PKR protein kinase. *J Interferon Cytokine Res*. **18**: 757-66.
- Teodoro JG y Branton PE.** 1997. Regulation of Apoptosis by Viral Gene Products. *J Virol*. **71**: 1739-1746.
- Tewari M y Dixit VM.** 1995. Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product. *J Biol Chem*. **270**: 3255-60.
- Tinland B y Hohn B.** 1995. Recombination between prokaryotic and eukaryotic DNA: integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA into the plant genome. *Genet Eng (NY)*. **17**: 209-29.
- Tomari Y y Zamore PD.** 2005. Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev*. **19**: 517-29.

Tran AT, Cortens JP, Du Q, Wilkins JA y Coombs KM. 2012. Influenza Virus Induces Apoptosis via BAD-mediated Mitochondria Dysregulation. *J Virol*. En prensa.

Valli A, Dujovny G y García JA. 2008. Protease activity, self interaction, and small interfering RNA binding of the silencing suppressor P1b from *Cucumber vein yellowing ipomovirus*. *J Virol*. **82**: 974-986.

Valli A, López-Moya JJ y García JA. 2009. RNA silencing and its suppressors in the plant-virus interplay. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd. pp. [http://www.els.net/\[DOI: 10.1002/9780470015902.a9780470021261\]](http://www.els.net/[DOI: 10.1002/9780470015902.a9780470021261]).

Valli A, Oliveros JC, Molnar A, Baulcombe D y García JA. 2011. The specific binding to 21-nt double-stranded RNAs is crucial for the anti-silencing activity of *Cucumber vein yellowing virus* P1b and perturbs endogenous small RNA populations. *RNA*. **17**: 1148-1158.

van den Berg TP, Eterradossi N, Toquin D y Meulemans G. 2000. Infectious bursal disease (Gumboro disease). *Rev Sci Tech*. **19**: 509-43.

van Loon AA, de Haas N, Zeyda I y Mundt E. 2002. Alteration of amino acids in VP2 of very virulent infectious bursal disease virus results in tissue culture adaptation and attenuation in chickens. *J Gen Virol*. **83**: 121-129.

van Rij RP, Saleh MC, Berry B, Foo C, Houk A, Antoniewsky C y Andino R. 2006. The RNA silencing endonuclease Argonaute 2 mediates specific antiviral immunity in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev*. **20**: 2985-95.

Van Stry M, Oguin T, Cheloufi S, Vogel P, Watanabe M, Pillai MR, Dash P, Thomas PG, Hannon GJ y Bix M. 2012. Enhanced susceptibility of Ago1/3 double-null mice to influenza A virus infection. *J Virol*. **86**: 4151-7.

Vargasson JM, Szittyá G, Burgyán J y Hall TM. 2003. Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. *Cell*. **115**: 799-811.

Voinet O. 2001. RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet*. **17**: 449-459.

von Einem UI, Gorbalenya AE, Schirrmeier H, Behrens SE, Letzel T y Mundt E. 2004. VP1 of infectious bursal disease virus is an RNA-dependent RNA polymerase. *J Gen Virol*. **85**: 2221-9.

Wang XH, Aliyari R, Li WX, Li HW, Kim K, Carthew R, Atkinson P y Ding SW. 2006. RNA interference directs innate immunity against viruses in adult *Drosophila*. *Science*. **312**: 452-4.

- Wang Y, Kato N, Jazag A, Dharel N, Otsuka M, Taniguchi H, Kawabe T, Omata M.** 2006. Hepatitis C virus core protein is a potent inhibitor of RNA silencing-based antiviral response. *Gastroenterology*. **130**: 883-92.
- Ward GA, Stover CK, Moss B y Fuerst TR.** 1995. Stringent chemical and thermal regulation of recombinant gene expression by vaccinia virus vectors in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. **92**: 6773-7.
- Weber F, Wagner V, Rasmussen SB, Hartmann R y Paludan SR.** 2006. Double-Stranded RNA Is Produced by Positive-Strand RNA Viruses and DNA Viruses but Not in Detectable Amounts by Negative-Strand RNA Viruses. *J Virol*. **80**: 5059-5064.
- Wei L, Hou L, Zhu S, Wang J, Zhou J y Liu J.** 2011. Infectious bursal disease virus activates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt signaling pathway by interaction of VP5 protein with the p85a subunit of PI3K. *Virology*. **417**: 211-20.
- Williams BR.** 1999. PKR: a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene*. **18**: 6112-20.
- Xie Z y Qi X.** 2008. Diverse small RNA-directed silencing pathways in plants. *Biochim Biophys Acta*. **1779**: 720-4.
- Xu HT, Si WD y Dobos P.** 2004. Mapping the site of guanylation of VP1, the protein primer for infectious pancreatic necrosis virus RNA synthesis. *Virology*. **322**: 199-210.
- Yamaguchi T, Setiyono A, Kobayashi M, Takigami S, Fukushi H y Hirai K.** 2000. Infectious bursal disease live vaccines: changes in the virus population during serial passage in chickens and chicken embryo fibroblast cells. *Avian Dis*. **44**: 284-90.
- Ye K, Malinina L y Patel DJ.** 2003. Recognition of small interfering RNA by a viral suppressor of RNA silencing. *Nature*. **426**: 874-878.
- Yin XM.** 2006. Bid, a BH3-only multi-functional molecule, is at the cross road of life and death. *Gene*. **369**: 7-19.
- Zambon RA, Vakharia VN y Wu LP.** 2006. RNAi is an antiviral immune response against a dsRNA virus in *Drosophila melanogaster*. *Cell Microbiol*. **8**: 880-9.
- Zhu Y, Cherukuri NC, Jackel JN, Wu Z, Crary M, Buckley KJ, Bisaro DM y Parris DS.** 2012. Characterization of the RNA silencing suppression activity of the Ebola virus VP35 protein in plants and mammalian cells. *J Virol*. **86**: 3038-49.
- Ziebel H, Payne T, Berry JO, Walsh JA y Carr JP.** 2007. A cucumber mosaic virus mutant lacking the 2b counter-defence protein gene provides protection against wild-type strains. *J Gen Virol*. **88**: 2862-2871.

8 PUBLICACIONES

The VP3 Factor from Viruses of *Birnaviridae* Family Suppresses RNA Silencing by Binding Both Long and Small RNA Duplexes

Adrian Valli^{1a}, Idoia Busnadiego¹, Varvara Maliogka^{2b}, Diego Ferrero, José R. Castón, José Francisco Rodríguez*, Juan Antonio García*

Centro Nacional de Biotecnología-CSIC, Madrid, Spain

Abstract

RNA silencing is directly involved in antiviral defense in a wide variety of eukaryotic organisms, including plants, fungi, invertebrates, and presumably vertebrate animals. The study of RNA silencing-mediated antiviral defences in vertebrates is hampered by the overlap with other antiviral mechanisms; thus, heterologous systems are often used to study the interplay between RNA silencing and vertebrate-infecting viruses. In this report we show that the VP3 protein of the avian birnavirus *Infectious bursal disease virus* (IBDV) displays, in addition to its capacity to bind long double-stranded RNA, the ability to interact with double-stranded small RNA molecules. We also demonstrate that IBDV VP3 prevents the silencing mediated degradation of a reporter mRNA, and that this silencing suppression activity depends on its RNA binding ability. Furthermore, we find that the anti-silencing activity of IBDV VP3 is shared with the homologous proteins expressed by both insect- and fish-infecting birnaviruses. Finally, we show that IBDV VP3 can functionally replace the well-characterized HCPPro silencing suppressor of *Plum pox virus*, a potyvirus that is unable to infect plants in the absence of an active silencing suppressor. Altogether, our results support the idea that VP3 protects the viral genome from host sentinels, including those of the RNA silencing machinery.

Citation: Valli A, Busnadiego I, Maliogka V, Ferrero D, Castón JR, et al. (2012) The VP3 Factor from Viruses of *Birnaviridae* Family Suppresses RNA Silencing by Binding Both Long and Small RNA Duplexes. PLoS ONE 7(9): e45957. doi:10.1371/journal.pone.0045957

Editor: Y. Adam Yuan, National University of Singapore, Singapore

Received: June 2, 2012; **Accepted:** August 23, 2012; **Published:** September 25, 2012

Copyright: © 2012 Valli et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants BIO2010-18541, BIO2009-12443 and BFU2011-25902 from the Spanish MICINN and KBBE-204429 from European Union. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: jfrodri@cnb.csic.es (JFR); jagarcia@cnb.uam.es (JAG)

^{1a} Current address: Department of Plant Sciences, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom

^{2b} Current address: Plant Pathology Laboratory, School of Agriculture, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece

These authors contributed equally to this work.

Introduction

RNA silencing collectively refers to diverse gene expression regulatory pathways that control a large number of cellular processes, such as developmental patterning, responses to biotic and abiotic stresses, and maintenance of genome stability. It is conserved in animals, plants, most fungi and some protists [1–3]. RNA silencing pathways involve small RNAs of 20–30 nucleotides, which are mainly derived from digestion of RNA duplexes by the action of RNase III-like nucleases called Dicer or Dicer-like (DCL) proteins [4–6]. These small RNAs are then associated with effector complexes, containing a protein belonging to the Argonaute (AGO) family, to guide sequence specific mRNA degradation, translational inhibition, or epigenetic modifications [7]. Interestingly, it has been well-established that RNA silencing plays a key antiviral role in plants, fungi and invertebrate animals, where infecting viruses induce the production of viral-derived small interfering (si)RNAs from their genomes, replication-intermediate double-stranded (ds)RNAs, fold-back structures within viral mRNAs, or dsRNA molecules produced by the action of RNA-dependent RNA polymerases (RdRps) on a single stranded viral RNA template [8–11]. Although the role of RNA silencing as

an antiviral mechanism in vertebrate animals is controversial, the fact that *bona fide* viral-derived small RNAs from different mammal-infecting viruses have recently been identified suggests that RNA silencing could also be an antiviral strategy in these organisms [12–14].

Viruses have evolved to overcome RNA silencing-based defences by encoding viral suppressors of RNA silencing (VSR) [15–18]. The key relevance of these proteins for the infection life cycle has been established in multiple virus/host combinations, showing that the absence of an active VSR results in greatly reduced viral infection [19,20–25]. Interestingly, it has been found that several vertebrate-infecting viruses also encode proteins with the ability to counteract RNA silencing, such as NS1 from *Influenza A virus* [26–29], VP30, VP35 and VP40 from *Ebola virus* [28,30,31], NSs from *La Crosse virus* [32], $\sigma 3$ from *Mammalian orthoreovirus type 3* [33], E3L from *Vaccinia virus* [28,29], Tas from *Primate foamy virus type 1* [34], Tat from *Human immunodeficiency virus* [35], Rex from *Human T-cell lymphotropic virus* [36], C and E2 proteins from *Hepatitis C virus* [37–39], 7a from *Severe acute respiratory syndrome virus* [40], and HVT063 from *Turkey herpesvirus* [41], presumably as part of the attack-defense-counterdefense arms race between viruses and their hosts (some of these RSSs were recently reviewed [42,43–46]).

Bimaviridae is a family of non-enveloped icosahedral viruses that infect birds, fishes, insects or rotifers [47]. Two members of the family, namely *Infectious bursal disease virus* (IBDV) and *Infectious pancreatic necrosis virus* (IPNV), are etiological agents of diseases imposing a heavy economical burden on the poultry and aquaculture industries, respectively. IBDV causes a highly acute immunosuppressive disease affecting juvenile domestic chickens [48]. IPNV is responsible for an acute systemic disease affecting different species of freshwater and marine fishes, mollusks, and crustaceans [49]. Birnaviruses contain a polyploid bipartite dsRNA genome that is packaged into a single virus particle [50]. Structural units are derived from a polyprotein precursor that is translationally self-cleaved to release three polypeptides, pVP2 (the capsid protein precursor), VP4 (the protease) and VP3 [51]. VP3 is a multitasking protein that has several activities throughout the viral life cycle. In addition to being a self-interacting protein [52], VP3 interacts with pVP2 during particle morphogenesis [53], with VP1 acting as a transcriptional activator [54], and with the dsRNA to make ribonucleoprotein complexes [55], a unique feature among dsRNA viruses. The atomic structure of VP3 was partially solved by X-ray crystallography to 2.3 Å [56].

The genome of most dsRNA viruses is contained within a specialized icosahedral capsid involved in transcription and replication of the dsRNA genome [57]. The structural integrity of these functional cores remains undisturbed after virus entry in the infected cell [58], protecting the dsRNA and replicative intermediates from host defense mechanisms. In contrast, birnaviruses lack this replicative core [59,60], but ribonucleoprotein complexes might have acquired some of its defensive functions.

Here, we report that different birnaviral VP3 proteins suppress the RNA silencing of a GFP reporter gene and that, despite their ability to bind ds-siRNAs, they appear to use a different mechanism than that of the well-studied short interfering (si)RNA-hijacking suppressors. In addition, we show that IBDV VP3 is able to functionally replace the well-characterized HCPro VSR in the plant-infecting *Plum pox virus* (PPV), which highlights the silencing suppression activity of VP3 in the context of a highly sensitive infection process.

Results

IBDV VP3 Suppresses Both Sense RNA and dsRNA-triggered RNA Silencing in Plants

The high affinity displayed by IBDV VP3 to bind long dsRNA molecules as well as to protect them from RNase III-mediated cleavage *in vitro* [55], prompted us to test whether IBDV VP3 could suppress RNA silencing *in vivo*. For this, we decided to use an heterologous transient expression system in *Nicotiana benthamiana* [15], as it provides readout of RNA silencing without the confounding induction of other immune and interferon-responsive pathways [61,62]. Different plasmids expressing untagged and N-terminal TAP (NTAP)-tagged versions of IBDV VP3 were constructed and transferred to *Agrobacterium tumefaciens*. Equivalent constructs expressing Influenza A virus NS1 and the well-characterized CVYV P1b silencing suppressor [63,64] were used as positive controls. A GFP-expressing plasmid (p35S:GFP) was used as the inducer, target and reporter of RNA silencing. For simplicity, we will refer to *Agrobacterium* strains by the name of the plasmid they carry. Leaf patches infiltrated with p35S:GFP plus either pMDC32 or pNTAPi empty vectors displayed the highest intensity of GFP fluorescence at 2–3 days post-agroinfiltration (dpa) (not shown). GFP fluorescence in these leaves dropped to hardly detectable levels by 6 dpa (Fig. 1A and not shown) and, consistently with this fact, Northern blot analysis showed very low

accumulation of GFP mRNA in them (Fig. 1A and data not shown). In contrast, leaves infiltrated with p35S:GFP plus pMDC32-NS1, p35S-NTAP-NS1 or p35S-NTAP-P1b, expressing untagged or TAP-tagged NS1, or TAP-tagged P1b, respectively, showed bright fluorescence at 6 dpa given the protection of GFP mRNAs from degradation by post-transcriptional gene silencing (Fig. 1A and data not shown). Interestingly, those leaf patches infiltrated with p35S:GFP plus either pMDC32-VP3 or p35S-NTAP-NS1 expressing untagged or TAP-tagged VP3, respectively, displayed GFP fluorescence as bright as positive controls at 6 dpa. Northern blot analysis revealed that the expression of IBDV VP3 inhibited GFP mRNA degradation very efficiently (Fig. 1A and data not shown).

To induce RNA silencing, the GFP mRNA is firstly converted to dsRNA. In order to better understand the mechanism by which IBDV VP3 suppresses RNA silencing, a third *Agrobacterium* strain expressing an inverted repeat (IR) that directly generate dsRNA from the 5' region of the GFP gene (p35S:GF-IR) was added to the infiltrated mixes. Given that GF-IR directed a fast and strong silencing of the GFP mRNA reporter, no fluorescence was detected in the infiltrated patches at 6 dpa in the absence of silencing suppressors, and consistent with this observation, a Northern blot assay showed no accumulation of GFP mRNA (Fig. 1B). In contrast, those patches expressing NTAP-VP3, NTAP-NS1 or NTAP-P1b displayed strong fluorescence and high accumulation of GFP mRNA as consequence of their ability to protect the reporter mRNA from silencing also in this assay (Fig. 1B).

IBDV VP3 and Influenza Virus NS1 Strongly Reduce the Generation of Primary siRNAs

Accumulation of specific siRNAs is a main hallmark of RNA silencing induction, and it can be observed in the Northern blot analyses of leaf patches infiltrated with either p35S:GFP or p35S:GFP plus p35S:GF-IR, together with the empty vector (Fig. 1A and B). In the sense RNA-triggered silencing assay, NTAP-P1b had, as previously reported [63], very little effect on GFP siRNA accumulation (Fig. 1A). In contrast, both NTAP-NS1 and NTAP-VP3 proteins appeared to abolish the generation of GFP siRNAs (Fig. 1A). Similarly, in the dsRNA-triggered silencing assay, NTAP-P1b had no effect on the generation of siRNAs from the 5' terminal two thirds of the GFP gene (siRNA GF), which derive mainly from the dsRNA trigger (p35S:GF-IR). However, the accumulation of siRNAs from the 3' terminal region of the GFP sequence, which are not encoded by p35S:GF-IR and, thus, are secondarily generated in the amplification phase of the RNA silencing process (siRNA P), is strongly inhibited by NTAP-P1b (Fig. 1B and [64]). Interestingly, expression of either NTAP-VP3 or NTAP-NS1 produced a strong reduction in the generation not only of P-derived siRNAs, but also of those siRNAs deriving from the GF dsRNA region (Fig. 1B), indicating that these proteins use a mechanism different from that of CVYV P1b to suppress the RNA silencing.

VP3 Efficiently Binds ds-small RNAs

It was previously reported that birnaviral VP3 proteins, including IBDV VP3, are able to bind dsRNAs molecules [65–67]. In order to test the ability of IBDV VP3 to interact with typical siRNA duplexes, EMSAs using ³²P-labelled synthetic ds-siRNAs carrying 2-nt overhang at their 3' ends were carried out. For these experiments, a 6xHis-tagged version of IBDV VP3 was produced and purified from insect cell cultures making use of recombinant baculoviruses. Purified VP3 samples were incubated with different dsRNA molecules, and complexes were then

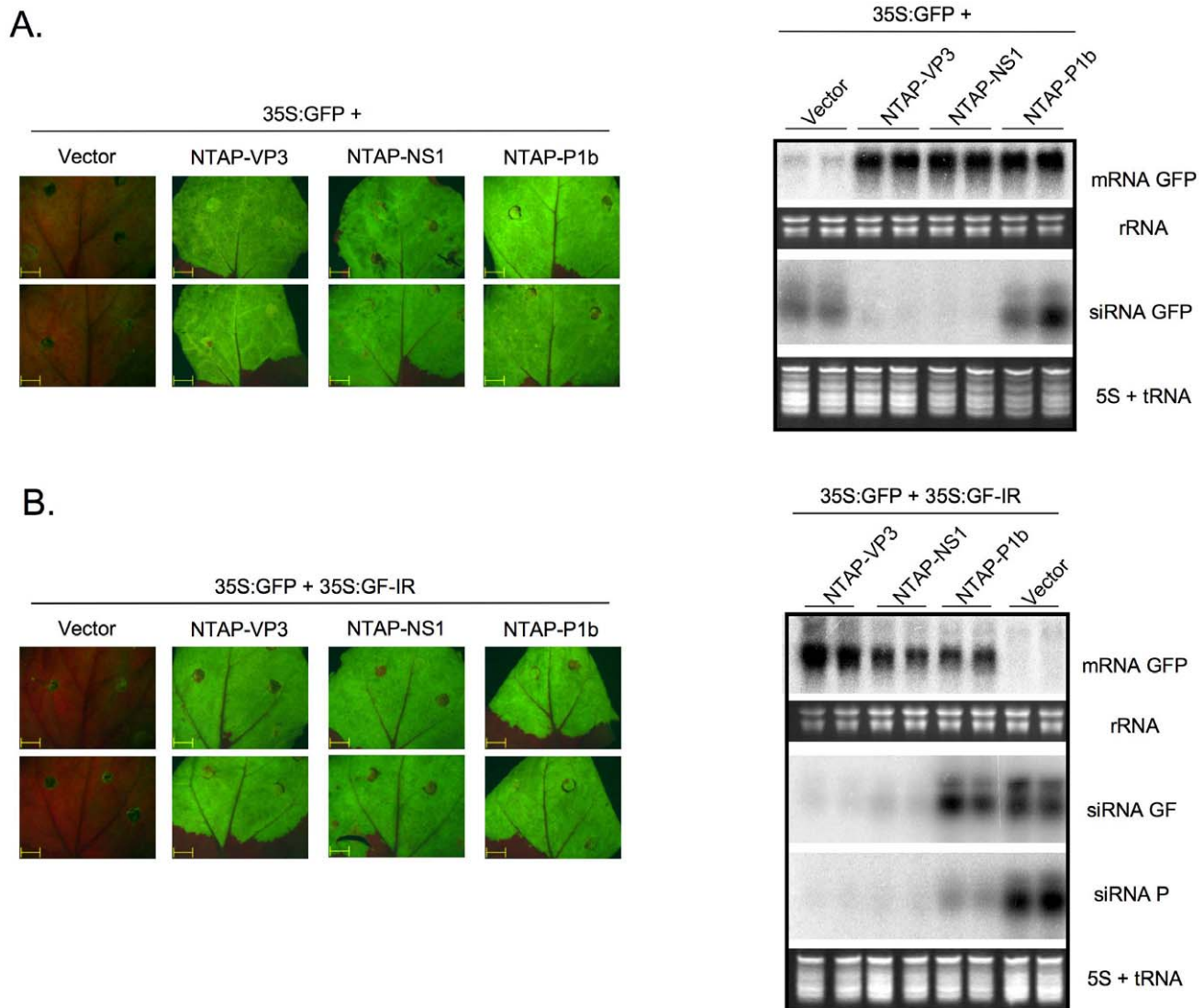


Figure 1. VP3 protein from IBDV suppresses the RNA silencing. ssRNA-triggered (A) and dsRNA-triggered (B) silencing assays in *N. benthamiana* plants. The figure shows GFP fluorescence pictures taken under an epifluorescence microscope using the same exposure time (left panels), and Northern blot analyses of GFP mRNA and GFP-derived siRNAs (right panels) in agroinfiltrated leaf patches from two plants expressing the indicated constructs, and collected at 6 days post agroinfiltration. Two different probes were used for detection of GFP siRNAs: the GF probe (for primary plus secondary siRNAs) corresponds to the GFP fragment included in the inverted repeat RNA expressed from the silencing trigger plasmid p35S:GF-IR; and the P probe (specific for secondary siRNAs) corresponds to the 3' terminal region of the GFP gene, which is not included in p35S:GF-IR. EtBr-stained rRNA and 5S+tRNA are shown as loading controls.

doi:10.1371/journal.pone.0045957.g001

resolved by gel electrophoresis (Fig. 2B). As expected from previous reports, purified IBDV VP3 was able to bind IBDV genomic dsRNA molecules producing a typical smear-like gel shifting of the dsRNA probe akin to that observed in isolated IBDV ribonucleoprotein complexes (Fig. 2B and [55]). Importantly, this protein was also able to interact with siRNA duplexes of both 21- and 26-nt of length, without apparent size specificity (Fig. 2B).

dsRNA Binding is Crucial for VP3-mediated RNA Silencing Suppression

The relevance of interactions between VSRs and diverse RNA molecules in silencing pathways has been previously reported (reviewed in [15,18]). A mutagenic approach was followed to assess the importance of VP3-dsRNA interactions in

the VP3 silencing suppression activity. Positively charged amino acids of the IBDV VP3 protein, predicted from crystal structure [56] to be from the region involved in dsRNA binding, were replaced by negatively charged Asp residues (Patch 1 and Patch 2, Fig. 2A). In addition, a deletion of the highly hydrophilic C-terminal region of IBDV VP3 (position 222–258), which was previously proposed as potentially relevant in both nucleic acid and protein-protein interactions [56], was engineered (Δ C, Fig. 2A). Mutant proteins were produced and purified from insect cells, and tested for their dsRNA binding capacity against the IBDV genomic RNAs, as well as a 32 P-labelled 21-nt siRNA duplex, by EMSA (Fig. 2C).

None of the multiple substitutions of positively charged amino acids affected the capacity of IBDV VP3 to form dimers (Fig. S1), suggesting that these mutations do not cause a drastic disturbance

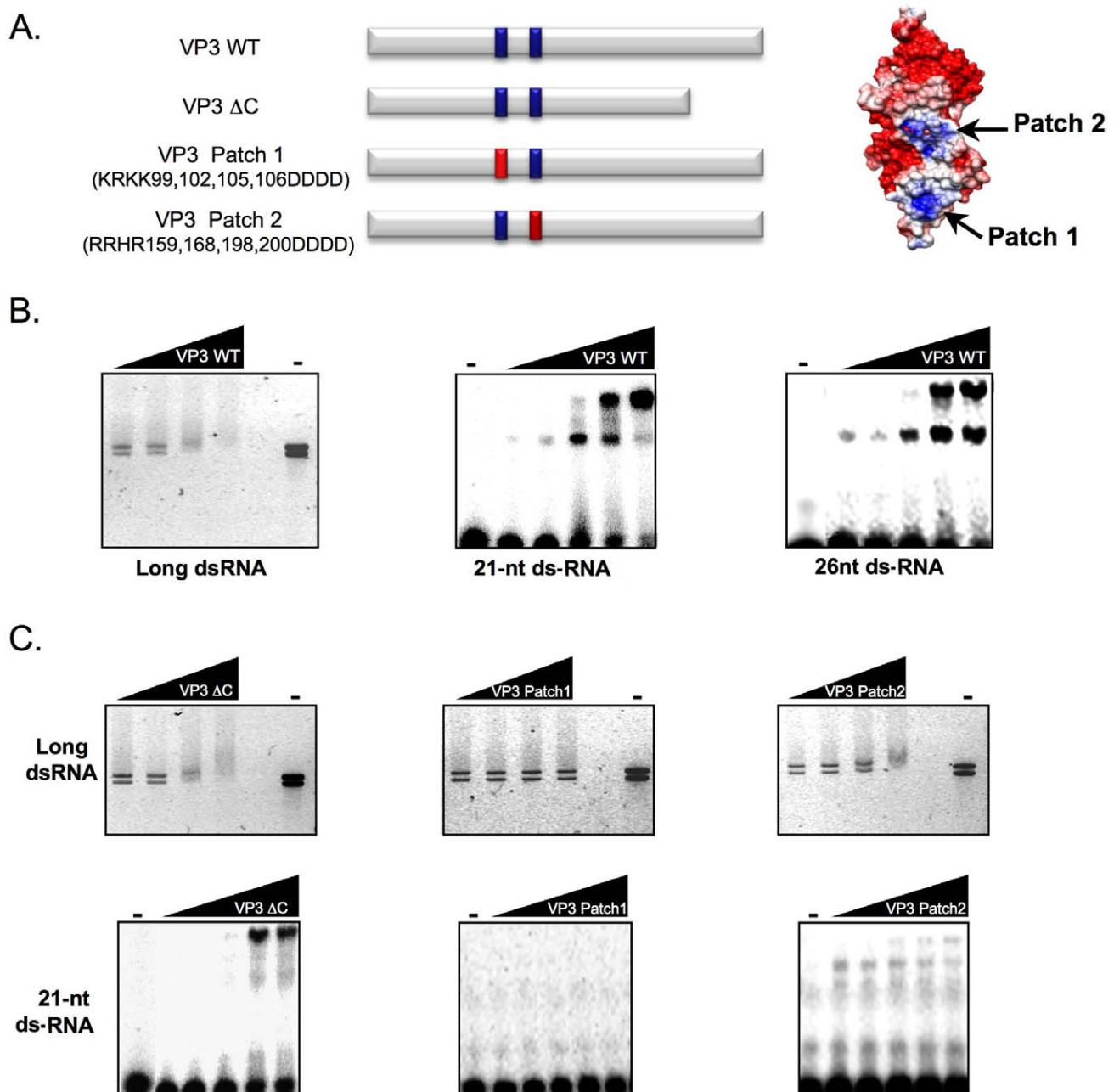


Figure 2. IBDV VP3 binds long and short dsRNAs, and the positively charged domain Patch 1 is involved in this interaction. (A) Schematic representation of wild type IBDV VP3 and derivative mutants used in this assay (red bars indicate mutated patches). The distribution of electrostatic potential on VP3 surface (adapted from [56]) is shown at the right. Both Patch 1 and Patch 2 positively charged regions are indicated in blue, whereas negatively charged regions of the protein are shown in red. (B) (Left panel) Purified IBDV VP3 WT protein (final concentration of 10, 20, 40 and 80 nM) was incubated with the IBDV genomic dsRNAs. (Central and right panels) Purified IBDV VP3 protein (final concentration of 80, 160, 320, 640 and 1200 nM) was incubated with 32 P-labelled 21-nt or 26-nt ds small RNAs. (C) (Upper panels) Purified VP3 Δ C (final concentration of 12, 24, 48 and 96 nM) and Patch 1 or Patch 2 mutant VP3 (final concentration of 10, 20, 40 and 80 nM) were incubated with IBDV genomic dsRNAs. (Lower panels) Purified VP3 Δ C (final concentration of 90, 180, 360, 720 and 1440 nM), and Patch 1 or Patch 2 mutant VP3 (final concentration of 80, 160, 320, 640 and 1200 nM) were incubated with 32 P-labelled 21-nt small RNAs. In both B and C, protein-IBDV genomic dsRNA complexes were resolved in agarose gels, stained with EtBr, and photographed under UV light, and protein-small RNA complexes were resolved in polyacrylamide gels and revealed by autoradiography.
doi:10.1371/journal.pone.0045957.g002

of the global structure of the protein. The VP3 Patch 2 mutant caused a band shift of both long dsRNA and ds-siRNA, although with less efficiency than the wild type VP3 (Fig. 2C), suggesting that the patch 2 domain could have an ancillary contribution to the RNA binding. In contrast, both VP3 Patch 1 (Fig. 2C) and

VP3 Patch 1+2 (data not shown) appear to be completely unable to reduce the mobility of long dsRNA and ds-siRNA, suggesting that VP3 Patch 1 plays a central role in binding to any species of dsRNA. The fact that VP3 Δ C causes shifts of long dsRNA and ds-siRNA in similar manner than those produced by the wild type

protein (Fig. 2C) suggests that the C-terminal part of VP3 is not relevant for RNA binding under the experimental conditions used here.

Patch 1, Patch 2 and ΔC mutations were engineered in pNTAP-VP3, and the effect of these modifications on the RNA silencing suppression activity of VP3 was assessed in a dsRNA-triggered silencing assay (Fig. 3). At 6 dpa, leaf patches expressing p35S:GFP, p35S:GF-IR, and either pNTAP-VP3, pNTAP-VP3Patch2, pNTAP-VP3 ΔC or the positive control pNTAP-P1b displayed very high fluorescence levels (Fig. 3A). Northern blot analysis confirmed an efficient protection of GFP mRNA from silencing degradation by the VP3Patch2 and VP3 ΔC mutants. In contrast, leaf patches expressing p35S:GFP, p35S:GF-IR, and either pNTAP-VP3Patch1 or pNTAP-VP3Patch1+2 showed no GFP fluorescence at 6 dpa, like control plants expressing p35S:GFP, p35S:GF-IR and an empty vector, suggesting that Patch1 mutation abolishes the VP3 anti-silencing activity. Northern blot analysis confirmed the fluorescence data since GFP mRNA was cleared from those tissues expressing VP3Patch1 or VP3Patch1+2 mutants at this time (Fig. 3B). Collectively, these results show a strong correlation between dsRNA interaction and RNA silencing suppression, supporting the idea that VP3 uses its dsRNA binding ability to suppress the RNA silencing.

Homologous VP3 Proteins from Bird-, Fly- and Fish-infecting Viruses Share the Ability to Suppress RNA Silencing

The *Bimaviridae* family consists of viruses able to infect birds, such as IBDV, aquatic organisms and insects. To determine whether homologous proteins to IBDV VP3 from other birnaviruses infecting non-avian hosts are able to suppress RNA silencing, the VP3 coding sequences of IPNV and *Drosophila X virus* (DXV), which infect fishes and flies, respectively, were synthesized and introduced in the pFastBachHtb and NTAPi vectors to be expressed in insect cells and plants, respectively. IPNV and DXV VP3 proteins purified from insect cells were able to interact with the IBDV genomic dsRNAs, as well as a synthetic 21-nt ds-siRNA, by EMSA (Fig. 4A) in similar manner than their IBDV counterpart. The ability of these VP3 proteins to suppress RNA silencing was assessed in a dsRNA-triggered silencing assay in *N. benthamiana* plants. At 6 dpa, when leaf patches agroinfiltrated with p35S:GFP plus p35S:GF-IR and an empty vector showed strong silencing of GFP reporter, patches expressing p35S:GFP plus p35S:GF-IR and any of the NTAPi-derived plasmids expressing VP3 from either IBDV, IPNV or DXV displayed strong GFP fluorescence. Concomitantly, high accumulation levels of GFP mRNA were detected in agroinfiltrated leaf patches expressing these birnaviral proteins (Fig. 4B and C), indicating that both IPNV and DXV VP3s also suppress the RNA silencing.

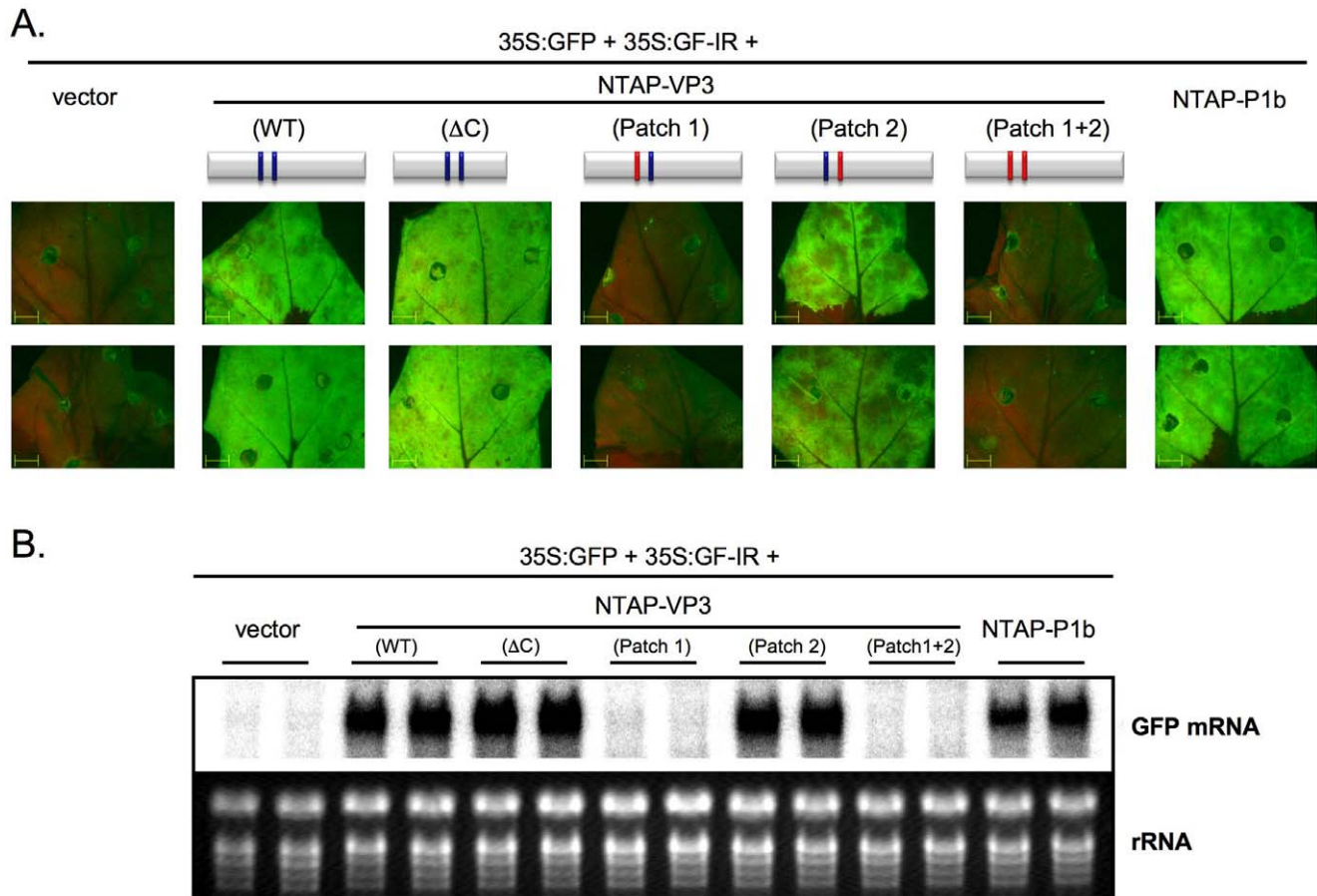


Figure 3. Positive correlation between dsRNA binding and RNA silencing suppression activity revealed by a dsRNA-triggered silencing suppression test. GFP fluorescence pictures taken under an epifluorescence microscope (A) and Northern blot analysis of GFP mRNA accumulation (B) of leaves of two *N. benthamiana* plants infiltrated with agrobacteria carrying the plasmid indicated above each lane (red bars indicate mutated patches). EtBr-stained rRNA is shown as loading control. doi:10.1371/journal.pone.0045957.g003

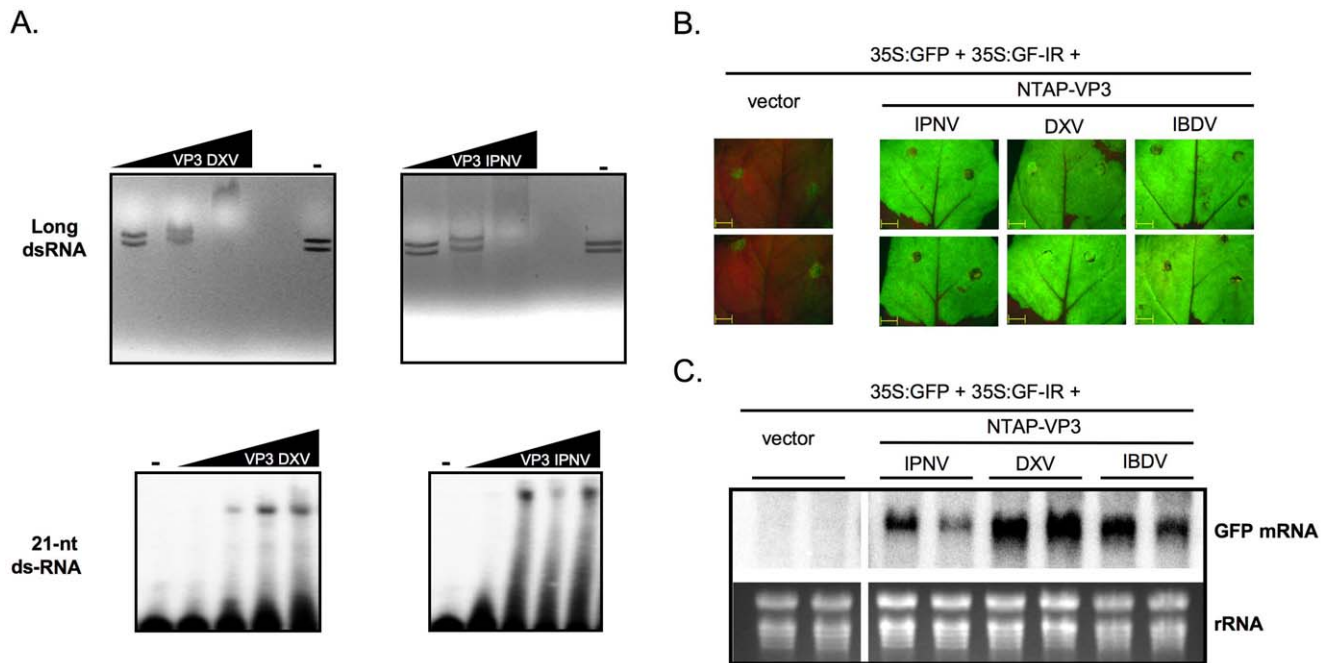


Figure 4. VP3 proteins from fish- and insect-infecting birnaviruses suppress RNA silencing in a dsRNA-triggered test. (A) (Upper panels) purified DXV VP3 (final concentration of 8.5, 17, 34 and 68 nM) and IPNV VP3 (final concentration of 10, 20, 40 and 80 nM) were incubated with IBDV genomic dsRNAs. Protein-dsRNA complexes were resolved in agarose gels, stained with EtBr, and photographed under UV light. (Lower panels) purified DXV VP3 (final concentration of 70, 140, 280, 560 and 1120 nM) and IPNV VP3 (final concentration of 80, 160, 320, 640 and 1280 nM) were incubated with 32 P-labelled 21-nt ds small RNAs. Protein-small RNA complexes were resolved in polyacrylamide gels and revealed by autoradiography. (B) GFP fluorescence pictures taken under an epifluorescence microscope using the same exposure time, and (C) Northern blot analysis of GFP mRNA in agroinfiltrated leaf patches from two *N. benthamiana* plants expressing the indicated constructs, and collected at 6 days post agroinfiltration. EtBr-stained rRNA is shown as loading control. doi:10.1371/journal.pone.0045957.g004

IBDV VP3 is able to Support PPV Infection in the Absence of its Natural Silencing Suppressor HCPro

To assess the ability of IBDV VP3 to counteract an RNA silencing-based antiviral mechanism, we made use of a plant/virus pathosystem consisting of *N. benthamiana* as host and the potyvirus PPV as pathogen. A PPV full-length cDNA clone was engineered to obtain a chimera expressing IBDV VP3 instead of its natural VSR HCPro (PPV-VP3, Fig. 5A). HCPro is expressed as part of a genomic-length polypeptide, from which it is excised by the serine proteinase activity of the upstream protein P1 and its own cysteine proteinase activity [68]. To allow the excision of VP3, which lacks auto-proteolytic activity, from the viral polypeptide, both ends of the VP3 coding sequence cloned in the PPV chimera were slightly modified to generate cleavage sites recognized by P1 and NIa, the third PPV proteinase. Thus, the VP3 produced by PPV-VP3 is expected to have two extra aa (SD) at its N-end and a QVVVHQ tail at its C-end.

Plants were biolistically inoculated with cDNA of PPV-VP3, as well as wild type PPV and HCPro deletion mutant (PPV-ΔHC) clones, which were used as positive and negative control, respectively. The infection processes were monitored by visual inspection under visible light and under a fluorescence microscope, taking advantage of the GFP tag expressed by the three viruses. As expected, at 7 days post-inoculation (dpi), GFP foci were observed in all the leaves that had been inoculated with wild type PPV, whereas no foci appeared in leaves of plants inoculated with PPV-ΔHC. Interestingly, GFP foci also appeared at the same time in leaves of all plants inoculated with PPV-VP3 (Fig. 5B, upper panel). Later in time, virus-like symptoms and GFP fluorescence were detected in the upper leaves of plants inoculated

with PPV and PPV-VP3 chimera (Fig. 5B, lower panels), supporting the idea that IBDV VP3 is able to replace HCPro in a potyviral infection.

Western blot analysis of inoculated and systemically infected tissues confirmed the visual observations (Fig. 5C). Similar levels of accumulation of PPV-VP3 and wild type PPV were detected in the inoculated leaves. Viral CP was also detected in upper non-inoculated leaves of plants infected with PPV-VP3, albeit in somewhat lower levels than in wild type PPV-infected plants (Fig. 5C, lower panel). Further observations at later time of infection (38 dpi) showed that plant infected with PPV-VP3, but not those infected with wild type PPV, recovered from viral infection, displaying neither GFP fluorescence nor viral symptoms in new growing leaves (data not shown). The recovery process was confirmed by Western blot analysis of samples collected at 38 dpi, which showed an obvious drop in PPV CP accumulation in older leaves when compared with younger leaves in PPV-VP3-infected plants, a phenomenon that did not occur in plants infected with wild type PPV (Fig. 5D).

Discussion

Viral RNAs, particularly in double-stranded conformation, are specifically recognized by a diverse battalion of sentinels that form part of the innate immune system of eukaryotes [10]. In many viral infections, dsRNA molecules are produced from their single-stranded counterparts as replication-intermediates or fold-back structures, or by action of RdRps, being then recognized by host factors for further activation of appropriate defence cascades. Interestingly, several viral families whose members have dsRNA

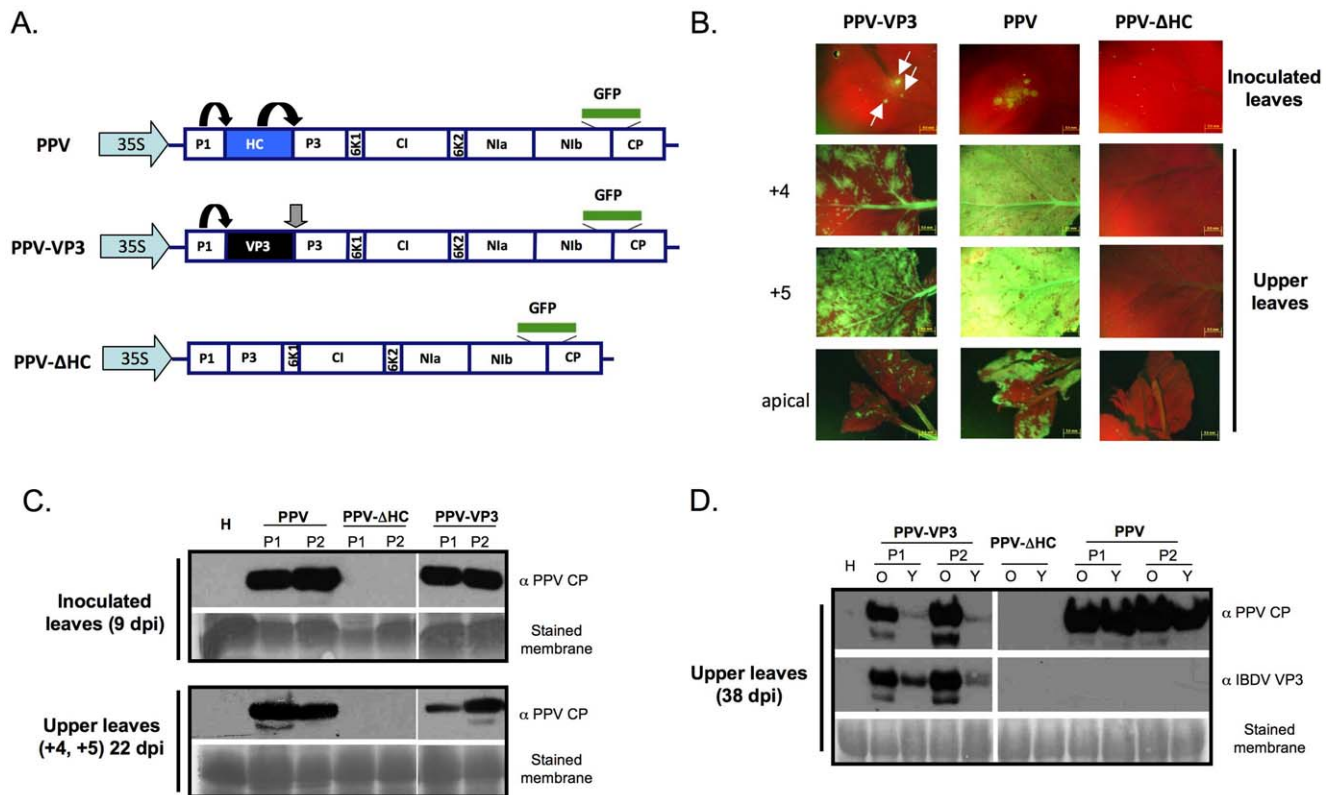


Figure 5. IBDV VP3 is able to functionally replace the HCPro silencing suppressor in a PPV infection. (A) Schematic representation of full-length cDNA clones derived from PPV and employed to infect *N. benthamiana* biologically. The coding sequence of the GFP protein inserted between the Nlb and CP cistrons is represented with a green rectangle. Black arrows indicate self-cleavages by the corresponding viral proteases, whereas the grey arrow indicates a cleavage *in trans* by the action of NlaPro. (B) GFP expression pattern of plants infected with the indicated viruses. Pictures of inoculated leaves collected at 7 days post inoculation (dpi), and the forth (+4) and fifth (+5) leaves above the inoculated one and the most apical leaves collected at 22 dpi were taken under an epifluorescence microscope. (C) Western blot analyses of plant tissue showing GFP foci collected at 9 dpi from inoculated leaves (upper panel) and at 22 dpi from upper non-inoculated leaves (+4 and +5 leaves) (lower panel) of two independent infected plants. (D) Western blot analysis of old (O) and young (Y) leaves collected at 38 dpi from two independent infected *N. benthamiana* plants. A polyclonal serum specific for PPV CP was used for assessment of virus accumulation, whereas immunoreaction with polyclonal sera specific for IBDV VP3 confirmed the identity of the infecting chimera. The membranes stained with Ponceau red showing the Rubisco are included as loading controls.

doi:10.1371/journal.pone.0045957.g005

genomes exist in the nature, which might demand additional protective measures to ensure efficient infection. The VP3 protein produced by members of the family *Bimaviridae*, is known to be involved in forming filamentous ribonucleoproteins that shield genomic dsRNAs [55]. In this report, we demonstrate that the VP3 proteins of several birnaviruses are also able to counteract RNA silencing by preventing formation of siRNAs from dsRNA silencing inducers.

Plants have been previously used to identify and study VSRs derived from vertebrate-infecting viruses given that the interpretation of results is not distorted by the presence of other dsRNA-related antiviral defences, like the interferon pathway [26,27,40,69]. Thus, we made use of two co-agroinfiltration assays in *N. benthamiana* plants. In the first assay, RNA silencing is triggered by the sense transcript of the GFP reporter gene, which is converted into dsRNA by a host RdRp, while in the second, RNA silencing is induced by an inverted-repeated construct that directly forms a GFP-specific dsRNA. IBDV VP3 protected GFP mRNA from RNA silencing-mediated degradation in both systems (Fig. 1). We therefore conclude that VP3 acts downstream the dsRNA formation, which is in agreement with the dsRNA nature of birnaviral genomes.

Many VSRs bind dsRNA [33,70], but not all dsRNA binding proteins have RNA silencing suppression activity [26,29]. Whereas some VSRs bind long dsRNA molecules without size specificity and interfere with Dicer cleavage activity [70–74], others disturb silencing by specific sequestration of siRNAs [64,75–78]. To establish the mechanism of action by which VP3 suppresses RNA silencing, we found that, in addition to its capacity to interact with long-dsRNAs [66,67], IBDV VP3 can effectively bind ds-small RNA molecules of different sizes (Fig. 2B). This includes dsRNAs with a length of 21-nt, which is the typical siRNA size class produced from RNA viruses during the infection cycle. Moreover, whereas the plant VSR P1b, which suppresses silencing by specific interaction with 21-nt small RNAs [64], mainly affected the accumulation of secondary siRNAs, both primary and secondary GFP-derived siRNAs were barely detected in leaves expressing either IBDV VP3 or Influenza virus NS1 (Fig. 1B). These data support the idea that VP3 and NS1 could use a dual mode of action, which would be different to that used by P1b, based on perturbing Dicer-mediated cleavage of long dsRNAs to produce siRNAs whilst also blocking the incorporation of these siRNAs into RNA-induced silencing complexes. A similar mechanism of action has been suggested for the VSR B2 from the insect nodavirus *Flock house virus* [71,79]. By using a mutagenic approach, we have

identified a region of basic residues, called here as Patch 1, involved in the dsRNA binding activity of IBDV VP3 and shown that these residues are also relevant for RNA silencing suppression (Fig. 2C and Fig. 3). Whereas these results support the contribution of dsRNA binding to the RNA silencing suppression activity of VP3, they do not provide clues on the relative importance of long dsRNA protection and siRNA sequestration since all mutations had similar effects on the VP3 binding to the different tested RNA molecules (Fig. 2C and Fig. 3). Interestingly, whereas mutations in another region of basic residues, here called as Patch 2, produced a partial reduction in the capacity of IBDV VP3 to interact with both long and short dsRNAs, they did not affect the ability of this protein to suppress the degradation of GFP mRNA by silencing (Fig. 2C and Fig. 3). This result indicates that a diminished dsRNA binding is enough to counteract the silencing machinery, as previously observed for the VSR P1b [64], and supports the idea that the VP3 Patch 2 could also be involved in RNA interaction.

The expression of VSRs is the general strategy used by plant viruses to counteract antiviral RNA silencing and some of them, like the potyvirus PPV, are unable to establish an infection in the absence of an active VSR [80,81]. Here, we found that IBDV VP3 is able to replace HCPro, the well-characterized VSR, in a PPV infection (Fig. 5). This result demonstrates the effectiveness of the RNA silencing suppression activity of IBDV VP3 to counteract host defences in a viral infection context. However, it is important to note that although the antisilencing activities of IBDV VP3 and PPV HCPro expressed from the PPV polyprotein are similar in an agroinfiltration assay (Fig. S2), the infection efficiency of PPV-VP3 chimera is somewhat lower than that of wild type PPV. *N. benthamiana* plants infected with this chimerical virus did eventually recover from the infection (Fig. 5D). These findings are in agreement with recent results obtained with PPV chimeras expressing different heterologous VSRs [82], supporting the idea that the capacity of a given VSR to replace HCPro in a potyviral infection does not rely only in the strength of suppressors, but also in the particular molecular mechanism that they use to suppress the RNA silencing.

It is well established that RNA silencing plays a key role in the antiviral innate immunity of invertebrate organisms [23,24,72,83], and it has been recently demonstrated that antiviral silencing can terminate viral infection in adult insects [84]. Although a broad range of insect viruses are known targets of antiviral RNA silencing, VSRs have been identified only in positive sense strand RNA viruses [84,85]. Interestingly, it has also been reported that RNA silencing is an efficient antiviral immune response against the birnavirus DXV [86], but the mechanism used by the virus to counteract this antiviral defence remained uncharacterized. Here, we provide the first evidence that the VP3 protein from DXV has RNA silencing suppression activity (Fig. 4), which suggests that it plays this counter defensive role during insect infections. The best-studied VSR of an insect virus, the B2 protein of alphanodaviruses [23,71,79], has a functional counterpart in fish betanodaviruses [87,88]. Similarly, our data show that VP3 from IPNV, a fish infecting birnavirus, also has the ability to suppress the RNA silencing. It is worth to mention that even though the primary amino acid sequence among these three VP3s is barely conserved, particularly remarkable in the case DXV VP3 [56], all of them interact with dsRNA without size specificity and counteract the RNA silencing (Fig. 4). Altogether, these results strongly support the idea that silencing suppression is a conserved activity among different VP3 proteins and that RNA silencing could play a defensive role in viral infections of fishes and birds. In agreement

with this postulate, an VSR from an avian herpesvirus has also been recently characterized [41].

Conclusive evidence demonstrating that an antiviral silencing mechanism operates in vertebrates is still lacking. Although early tests failed to find viral-derived siRNAs, the hallmark of antiviral silencing, in different infected organisms (reviewed by [89]), the availability of deep sequencing technologies has recently allowed not only the identification of siRNAs derived from a wide set of mammal-infecting RNA viruses, but also revealed their association with silencing effector complexes [13,14]. These data, together with the observation that many mammal-infecting RNA viruses encode VSRs [42], suggest that RNA silencing of vertebrates is, to some extent, engaged in fighting against RNA viruses. It is important to note that the relationship between RNA silencing and viruses could be multifaceted in these organisms; hence, in addition to the possible cis-acting effect of viral-derived siRNAs, some of these molecules are able to target host genes involved in antiviral defense [90,91]. Moreover, several host miRNA have been shown to contribute to virus resistance [34,92–96], whereas others are essential for the replication of the virus [97]. In this intricate scenario, the contribution of VSRs is expected to be tightly regulated. In general, VSRs from mammal-infecting viruses also participate in the counter defense against other antiviral responses of the host, such as the interferon system, which add a further level of intricacy to the activity of these proteins [29,31]. Cross-talk between RNA silencing and IFN-dependent defense pathways have been reported [13,62,94] and consequently the dsRNA-binding abilities of these VSRs could contribute to interference with both IFN- and RNA silencing-mediated antiviral defences in tandem [29]. Therefore, the dsRNA binding activity of IBDV VP3 could prevent genomic dsRNAs to induce RNA silencing, as well as modulate other dsRNA-induced antiviral defences. In agreement with this hypothesis, recent results indicate that IBDV VP3 inhibits PKR-dependent apoptosis induced by the expression of the viral protein VP2 (Busnadiego et al., *submitted*).

Materials and Methods

Plant Hosts

Agroinfiltration and viral infectivity assays were performed in *Nicotiana benthamiana* plants. All plants were grown in a greenhouse maintained at 16 hours light with supplementary illumination and a temperature range of 19–23°C.

Plasmids

Recombinant baculoviruses (rBVs) expressing 6 × His-tagged versions of full-length IBDV VP3 as well as the VP3ΔC, which lacks the 36 C-terminal amino acid residues, were previously described [56,66]. The construction of the rBV expressing a 6 × His-tagged version of VP3 Patch1 mutant (rBV hisVP3Patch1) was performed as follows. A 789 bp DNA fragment coding for a mutant version of VP3 with four aa substitutions (K99D, R102D, K105D and K106D, VP3MutPatch1) flanked by *Bam*HI and *Eco*RI restriction sites, was generated by gene synthesis (Genscript) and inserted into the *Eco*RV site located in the multiple cloning site (MCS) of the pUC57 plasmid. This plasmid was digested with *Bam*HI and *Eco*RI and the fragment containing the mutated VP3 ORF was purified and inserted into the MCS of the baculovirus transfer vector pFastBacHtb (Invitrogen), previously digested with the same restriction enzymes. The resulting plasmid (pFBhisVP3Patch1) was then used to generate the corresponding rBV making use of the Bac-to-Bac system, following the manufacturer's instructions (Invitrogen). The generation of the rBV expressing a 6 × His-tagged version of VP3 Patch2 mutant

(rBV hisVP3Patch2) that carries four point mutations (R159D, R168D, H198D and R200D) was done using the approach described above. The construction of the rBV expressing a 6 × His-tagged version of VP3 Patch1+2 mutant (rBV hisVP3-Patch1+2) was performed by replacing the *Bam*HI/*Xba*I fragment from the hisVP3Patch2 ORF by that of its hisVP3Patch1 counterpart. The construction of rBVs expressing the VP3 from DXV and IPNV was performed as follows. DNA fragments coding for the DXV VP3 and the IPNV VP flanked by *Bam*HI and *Eco*RI were generated by gene synthesis (Genscript) and inserted into the *Eco*RV site of pUC57. Cloning of these ORFs into the baculovirus transfer vector pFastBacHtb to generate pFBhisVP3dxv and pFBhisVP3ipnv, and the generation of the corresponding rBVs, were carried out as described above.

To construct plasmids expressing the different versions of VP3 (wild type and mutants) and Influenza A NS1 in plants, GATEWAY technology (Invitrogen) was applied. Hence, pDONR-207 (Invitrogen) was used as donor vector, whereas pMDC32 (provided by Mark Curtis, University of Zurich) [98] and pNTAPi (provided by Michael Fromm, University of Nebraska) [99] were used as destination vectors. Primers and templates used for PCR amplifications to generate the different entry vectors are listed in Tables S1 and S2 in the supplemental material.

Expression vectors producing untagged CVYV P1b (pMDC32-P1b), untagged and TAP-tagged Influenza NS1 (pMDC32-NS1 and p35S-NTAP-NS1, respectively), untagged and TAP-tagged IBDV VP3 (pMDC32-VP3 and p35S-NTAP-VP3, respectively), TAP-tagged mutant versions of IBDV VP3 (p35S-NTAP-VP3patch1, p35S-NTAP-VP3patch2, p35S-NTAP-VP3patch1+2 and p35S-NTAP-VP3ΔC), TAP-tagged IPNV VP3 (p35S-NTAP-VP3ipnv) and TAP-tagged DXV VP3 (p35S-NTAP-VP3dxv) were constructed by LR clonase reactions between the corresponding pDONR entry vectors and either the destination vectors pMDC32 or pNTAPi (Table S1). Plasmid pDONR-P1b and p35S-NTAP-P1b were previously described [63].

Cloning of the IBDV VP3 ORF in a PPV full-length cDNA yielding pICPPV-VP3 made use of an intermediate clone, pGEMT-p1p3, and the full-length cDNA clone pICPPV-NK-GFPn, according to the procedure described by Maliogka et al. (manuscript submitted for publication). Primers and templates used for IBDV VP3 amplification are listed in Tables S1 and S2. pICPPV-NK-GFPn (P. Sáenz, M.R. Fernández-Fernández and J.A. García, unpublished results), a PPV full-length cDNA clone derived from pICPPV-NK-GFP (Fernández-Fernández, 2001 #3289), and pICPPV-ΔHC [80] were used as control. The accuracy of all the constructs was verified by restriction digestion analysis, as well as DNA sequencing of all regions derived from PCR amplifications.

A. tumefaciens C58C1 strains carrying p35S:GFP [100] plus pCH32 [101], and p35S:GF-IR [102] were kindly provided by David Baulcombe (University of Cambridge, United Kingdom).

Agroinfiltration and Fluorescence Imaging

N. benthamiana plants were infiltrated with *A. tumefaciens* C58C1 strain carrying the indicated plasmids as previously described [103]. GFP fluorescence was observed under a Leica MZ FLIII fluorescence microscope with excitation and barrier filters of 480/40 and 510 nm, respectively. Pictures of GFP were caught with an Olympus DP 70 camera and the software DP Controller and DP manager.

RNA Extraction and Northern Blot Analysis

Samples of large and small RNAs were prepared from agroinfiltrated leaf patches and subjected to Northern blot analysis as previously described [103]. GFP siRNA were detected with ³²P-labeled GF and P riboprobes, which were prepared by transcription with SP6 RNA polymerase from *Sac*II-linearized pGEMT-GF and pGEMT-P, respectively. These plasmids contain the nt 4 to 403 (GF) and 404 to 717 (P) of the GFP gene cloned in pGEM-T.

Expression and Purification of Different VP3 Proteins from Insect Cells

Procedures to express recombinant 6xHis-tagged VP3s in insect cells by using rBVs as well as to purify the polypeptides by metal-affinity chromatography were previously described [52].

Gel Filtration Analysis

Affinity-purified 6xHis-tagged VP3s were analyzed by gel filtration using a fast protein liquid chromatography system (AKTA FPLC, Pharmacia) with a Superdex-200 5/150 column (Pharmacia) previously calibrated with catalase (158 kDa), serum albumin (68 kDa), ovalbumine (50 kDa) and chymotrypsinogen A (21 kDa). Column equilibration and chromatography were performed at a flow rate of 0.5 ml/min in a buffer consisting of 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl at 4°C.

Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Synthetic ds-siRNA with 2-deoxynucleotides 3' overhangs (5'CUUACGCGAGUCUUCGATT3'/5'UCGAAGUACUCAGCGUAAAGTT3') (Sigma) were labelled with γ-³²P-ATP using T4 PNK (Promega). IBDV genomic double-stranded RNAs were prepared accordingly to Luque et al [55].

Either labelled siRNA (2 nM final concentration) or genomic IBDV RNAs (7.5 nM final concentration) were incubated with different amounts of the indicated affinity chromatography-purified proteins for 30 min at room temperature in a reaction mixture (20 μl) containing small RNA-binding buffer (10 mM TrisHCl pH8, 10 mM Glycine, 2 mM DTT) or long dsRNA-binding buffer (50 mM TrisHCl pH8, 150 mM NaCl, 0.5 μg/ul BSA), respectively. After incubation, protein-small RNA and protein-long dsRNA complexes were resolved on 5% polyacrylamide-containing 0.5×Tris-borate-EDTA gels and 1% agarose-containing 0.5×Tris-borate-EDTA gels, respectively. Polyacrylamide gels were dried and exposed to X-ray sensitive films. Agarose gels were stained with ethidium bromide and exposed under UV light.

Biolistic Inoculation

The Helios Gene Gun System (Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A.) was used for biolistic inoculation. Microcarrier cartridges were prepared from 2 different clones per construct, with 1.0 μm gold particles coated with the different plasmids at a DNA loading ratio of 2 μg/mg of gold and a microcarrier loading of 0.5 mg/shooting. Helium pressure of 7 bars was used for shooting plants. Each cartridge was shot twice onto two leaves of each plant.

Western Blot of Infected Plants

Tissue samples of inoculated leaves were harvested under UV light from GFP expressing foci, whereas tissue of upper non-inoculated leaves were harvested from the indicated whole leaves. Control samples corresponding to non-infected leaves were taken from equivalent areas. Preparation of protein samples, SDS-PAGE electrophoresis, and electroblotting were done as previously described [103]. Specific proteins were detected using anti-IBDV

VP3 rabbit serum [104] or anti-PPV CP rabbit serum, as primary antibodies, and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG (Jackson) as secondary reagent. The immunostained proteins were visualized by enhanced chemiluminescence detection with a LifeABlot kit (Euroclone). Ponceau red staining was used to check the global protein content of the samples.

Supporting Information

Figure S1 Amino acid changes in Patch 1 and Patch 2 domains do not alter the proper dimerization of IBDV VP3. Analytical gel-filtration assays of wild type IBDV VP3 and its Patch 1 and Patch 2 mutant derivatives. The arrow indicates the elution position of IBDV VP3 dimer. (TIF)

Figure S2 Efficient anti-silencing activities of IBDV VP3 forming part of the PPV polyprotein. (A) Schematic representation of the GFP and viral-derived constructs used in the RNA silencing suppression test in *N. benthamiana* plants. Black arrows indicate self-cleavages by the corresponding viral proteases, whereas the grey arrow indicates a cleavage *in trans* by the action of NIaPro. GFP fluorescence photos taken under an epifluorescence microscope (B) and Northern blot analyses of GFP mRNA (C) from leaves of two

independent plants collected at 6 days post agroinfiltration (two different clones of the indicated VSR were separately analyzed). EtBr-stained rRNA is shown as loading control.

(TIF)

Table S1 List of primers and templates used for PCR in the construction of different entry vectors.

(DOC)

Table S2 Sequence of PCR primers used in the plasmid constructions.

(DOC)

Acknowledgments

We are grateful to David Baulcombe for providing p35S:GFP and p35S:GF-IR vectors, Mark Curtis for providing pMDC32, and Michael Fromm for providing pNTAPI. We also thank Jake Harris for English proofreading.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AV IB JRC JFR JAG. Performed the experiments: AV IB VM DF. Analyzed the data: AV IB VM DF JFR JAG. Wrote the paper: AV IB JFR JAG.

References

- Cerutti H, Casas-Mollano JA (2006) On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. *Curr Genet* 50: 81–99.
- Novina CD, Sharp PA (2004) The RNAi revolution. *Nature* 430: 161–164.
- Shabalina SA, Koonin EV (2008) Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. *Trends Ecol Evol* 23: 578–587.
- Ghildiyal M, Zamore PD (2009) Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature Rev Genet* 10: 94–108.
- Carthew RW, Sontheimer EJ (2009) Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136: 642–655.
- Xie Z, Qi X (2008) Diverse small RNA-directed silencing pathways in plants. *Biochim Biophys Acta*.
- Baulcombe D (2005) RNA silencing. *Trends Biochem Sci* 30: 290–293.
- Voinnet O (2001) RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet* 17: 449–459.
- Aliyari R, Ding SW (2009) RNA-based viral immunity initiated by the Dicer family of host immune receptors. *Immunol Rev* 227: 176–188.
- Ding SW (2010) RNA-based antiviral immunity. *Nat Rev Immunol* 10: 632–644.
- Csorba T, Pantaleo V, Burguán J (2009) RNA silencing: an antiviral mechanism. *Adv Virus Res* 75: 35–71.
- Ding SW, Li HW, Lu R, Li F, Li WX (2004) RNA silencing: a conserved antiviral immunity of plants and animals. *Virus Res* 102: 109–115.
- Parameswaran P, Sklan E, Wilkins C, Burgon T, Samuel MA, et al. (2010) Six RNA viruses and forty-one hosts: viral small RNAs and modulation of small RNA repertoires in vertebrate and invertebrate systems. *PLoS Pathog* 6: e1000764.
- Schopman NC, Willemsen M, Liu YP, Bradley T, van Kampen A, et al. (2012) Deep sequencing of virus-infected cells reveals HIV-encoded small RNAs. *Nucleic Acids Res* 40: 414–427.
- Valli A, López-Moya JJ, García JA (2009) RNA silencing and its suppressors in the plant-virus interplay. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd. pp. <http://www.els.net/> [DOI: 10.1002/9780470015902.a9780470021261].
- Diaz-Pendon JA, Ding SW (2008) Direct and indirect roles of viral suppressors of RNA silencing in pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol* 46: 303–326.
- Shimura H, Pantaleo V (2011) Viral induction and suppression of RNA silencing in plants. *Biochim Biophys Acta* 1809: 601–612.
- Burguán J, Havelda Z (2011) Viral suppressors of RNA silencing. *Trends Plant Sci* 16: 265–272.
- Qiu WP, Park JW, Scholthof HB (2002) Tombusvirus p19-mediated suppression of virus-induced gene silencing is controlled by genetic and dosage features that influence pathogenicity. *Mol Plant-Microbe Interact* 15: 269–280.
- Szittyá G, Molnár A, Silhavy D, Hornyák C, Burguán J (2002) Short defective interfering RNAs of tombusviruses are not targeted but trigger post-transcriptional gene silencing against their helper virus. *Plant Cell* 14: 359–372.
- Diaz-Pendon JA, Li F, Li WX, Ding SW (2007) Suppression of antiviral silencing by cucumber mosaic virus 2b protein in Arabidopsis is associated with drastically reduced accumulation of three classes of viral small interfering RNAs. *Plant Cell* 19: 2053–2063.
- Ziebell H, Payne T, Berry JO, Walsh JA, Carr JP (2007) A cucumber mosaic virus mutant lacking the 2b counter-defence protein gene provides protection against wild-type strains. *J Gen Virol* 88: 2862–2871.
- Li HW, Li WX, Ding SW (2002) Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. *Science* 296: 1319–1321.
- Wang XH, Aliyari R, Li WX, Li HW, Kim K, et al. (2006) RNA interference directs innate immunity against viruses in adult *Drosophila*. *Science* 312: 452–454.
- Lu R, Yigit E, Li WX, Ding SW (2009) An RIG-I-like RNA Helicase mediates antiviral RNAi downstream of viral siRNA biogenesis in *Caenorhabditis elegans* - art. no. e1000286. *PLoS Pathog* 5: 286–286.
- Bucher E, Hemmes H, de Haan P, Goldbach R, Prins M (2004) The influenza A virus NS1 protein binds small interfering RNAs and suppresses RNA silencing in plants. *J Gen Virol* 85: 983–991.
- Delgadillo MO, Sáenz P, Salvador B, García JA, Simón-Mateo C (2004) Human influenza virus NS1 protein enhances viral pathogenicity and acts as an RNA silencing suppressor in plants. *J Gen Virol* 85: 993–999.
- Haasnoot J, de Vries W, Geutjes EJ, Prins M, de Haan P, et al. (2007) The Ebola virus VP30 protein is a suppressor of RNA silencing. *PLoS Pathog* 3: e86.
- Li WX, Li H, Lu R, Li F, Dus M, et al. (2004) Interferon antagonist proteins of influenza and vaccinia viruses are suppressors of RNA silencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 1350–1355.
- Fabozzi G, Nabel CS, Dolan MA, Sullivan NJ (2011) Ebolavirus proteins suppress the effects of small interfering RNA by direct interaction with the mammalian RNA interference pathway. *J Virol* 85: 2512–2523.
- Zhu Y, Celebi Cherukuri N, Jackel JN, Wu Z, Crary M, et al. (2012) Characterization of the RNA silencing suppression activity of the Ebola Virus VP30 protein in plants and mammalian cells. *J Virol* 86: 3038–3049.
- Soldan SS, Plasmeyer ML, Matukonis MK, González-Scarano F (2005) La Crosse virus nonstructural protein NSs counteracts the effects of short interfering RNA. *J Virol* 79: 234–244.
- Lichner Z, Silhavy D, Burguán J (2003) Double-stranded RNA-binding proteins could suppress RNA interference-mediated antiviral defences. *J Gen Virol* 84: 975–980.
- Lecellier C-H, Dunoyer P, Arar K, Lehmann-Che J, Eyquem S, et al. (2005) A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. *Science* 308: 557–560.
- Bennasser Y, Le SY, Benkirane M, Jeang KT (2005) Evidence that HIV-1 encodes an siRNA and a suppressor of RNA silencing. *Immunity* 22: 607–619.
- Abe M, Suzuki H, Nishitsuji H, Shida H, Takaku H (2010) Interaction of human T-cell lymphotropic virus type I Rex protein with Dicer suppresses RNAi silencing. *FEBS Lett* 584: 4313–4318.
- Chen WX, Zhang ZZ, Chen J, Zhang J, Zhang J, et al. (2008) HCV core protein interacts with Dicer to antagonize RNA silencing. *Virus Res* 133: 250–258.
- Wang Y, Kato N, Jazag A, Dharel N, Otsuka M, et al. (2006) Hepatitis C virus core protein is a potent inhibitor of RNA silencing-based antiviral response. *Gastroenterology* 130: 883–892.

39. Ji J, Glaser A, Wernli M, Berke JM, Moradpour D, et al. (2008) Suppression of short interfering RNA-mediated gene silencing by the structural proteins of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 89: 2761–2766.
40. Karjee S, Minhas A, Sood V, Ponia SS, Banerjee AC, et al. (2011) The 7a accessory protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus acts as an RNA silencing suppressor. *J Virol* 84: 10395–10401.
41. Jing XL, Fan MN, Jia G, Liu LW, Ma L, et al. (2011) A multifunctional protein encoded by *Turkey herpesvirus* suppresses RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. *J Virol* 85: 12792–12803.
42. Bivalkar-Mehla S, Vakharia J, Mehla R, Abreha M, Kanwar JR, et al. (2011) Viral RNA silencing suppressors (RSS): novel strategy of viruses to ablate the host RNA interference (RNAi) defense system. *Virus Res* 155: 1–9.
43. Li HW, Ding SW (2005) Antiviral silencing in animals. *FEBS Lett* 579: 5965–5973.
44. Wu Q, Wang X, Ding SW (2010) Viral suppressors of RNA-based viral immunity: host targets. *Cell Host Microbe* 8: 12–15.
45. de Vries W, Berkhout B (2008) RNAi suppressors encoded by pathogenic human viruses. *Internat J Biochem Cell Biol* 40: 2007–2012.
46. Haasnoot J, Westerhout EM, Berkhout B (2007) RNA interference against viruses: strike and counterstrike. *Nat Biotechnol* 25: 1435–1443.
47. Delmas B, Kibenge FSB, Leong JC, Mundt E, Vakaharia VN, et al. (2004) Family *Bimaviridae*. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Bal LA, editors. *Virus Taxonomy*, VIII Report of the ICTV. London: Elsevier/Academic Press. 561–569.
48. van den Berg TP, Erreraadossi N, Toquin D, Meulemans G (2000) Infectious bursal disease (Gumboro disease). *Rev Sci Tech* 19: 509–543.
49. Gómez-Casado E, Estepa A, Coll JM (2011) A comparative review on European-farmed finfish RNA viruses and their vaccines. *Vaccine* 29: 2657–2671.
50. Luque D, Rivas G, Alfonso C, Carrascosa JL, Rodriguez JF, et al. (2009) Infectious bursal disease virus is an icosahedral polyloid dsRNA virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 2148–2152.
51. Birghan C, Mundt E, Gorbaleya AE (2000) A non-canonical lon proteinase lacking the ATPase domain employs the ser-Lys catalytic dyad to exercise broad control over the life cycle of a double-stranded RNA virus. *EMBO J* 19: 114–123.
52. Maraver A, Ona A, Abaitua F, Gonzalez D, Clemente R, et al. (2003) The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical role in capsid assembly. *J Virol* 77: 6438–6449.
53. Saugar I, Irigoyen N, Luque D, Carrascosa JL, Rodriguez JF, et al. (2010) Electrostatic interactions between capsid and scaffolding proteins mediate the structural polymorphism of a double-stranded RNA virus. *J Biol Chem* 285: 3643–3650.
54. Garriga D, Navarro A, Querol-Audi J, Abaitua F, Rodriguez JF, et al. (2007) Activation mechanism of a noncanonical RNA-dependent RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 20540–20545.
55. Luque D, Saugar I, Rejas MT, Carrascosa JL, Rodriguez JF, et al. (2009) Infectious bursal disease virus: ribonucleoprotein complexes of a double-stranded RNA virus. *J Mol Biol* 386: 891–901.
56. Casañas A, Navarro A, Ferrer-Orta C, González D, Rodriguez JF, et al. (2008) Structural insights into the multifunctional protein VP3 of birnaviruses. *Structure* 16: 29–37.
57. Reinisch KM (2002) The dsRNA Viridae and their catalytic capsids. *Nat Struct Mol Biol* 9: 714–716.
58. Harrison SC (2007) Principles of virus structure. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, et al., editors. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 59–98.
59. Coulibaly F, Chevalier C, Gutsche I, Pous J, Navaza J, et al. (2005) The birnavirus crystal structure reveals structural relationships among icosahedral viruses. *Cell* 120: 761–772.
60. Saugar I, Luque D, Ona A, Rodriguez JF, Carrascosa JL, et al. (2005) Structural polymorphism of the major capsid protein of a double-stranded RNA virus: an amphipathic alpha helix as a molecular switch. *Structure* 13: 1007–1017.
61. Bridge AJ, Pebernard S, Ducaux A, Nicoulaz AL, Iggo R (2003) Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet* 34: 263–264.
62. Sledz CA, Holko M, De Veer MJ, Silverman RH, Williams BR (2003) Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* 5: 834–839.
63. Valli A, Dujovny G, Garcia JA (2008) Protease activity, self interaction, and small interfering RNA binding of the silencing suppressor P1b from *Cucumber vein yellowing ipomovirus*. *J Virol* 82: 974–986.
64. Valli A, Oliveros JC, Molnar A, Baulcombe D, Garcia JA (2011) The specific binding to 21-nt double-stranded RNAs is crucial for the anti-silencing activity of *Cucumber vein yellowing virus* P1b and perturbs endogenous small RNA populations. *RNA* 17: 1148–1158.
65. Tacken MG, Peeters BP, Thomas AA, Rottier PJ, Boot HJ (2002) Infectious bursal disease virus capsid protein VP3 interacts both with VP1, the RNA-dependent RNA polymerase, and with viral double-stranded RNA. *J Virol* 76: 11301–11311.
66. Kochan G, Gonzalez D, Rodriguez JF (2003) Characterization of the RNA-binding activity of VP3, a major structural protein of Infectious bursal disease virus. *Arch Virol* 148: 723–744.
67. Pedersen T, Skjesol A, Jorgensen JB (2007) VP3, a structural protein of infectious pancreatic necrosis virus, interacts with RNA-dependent RNA polymerase VP1 and with double-stranded RNA. *J Virol* 81: 6652–6663.
68. Carrington JC, Cary SM, Parks TD, Dougherty WG (1989) A second proteinase encoded by a plant potyvirus genome. *EMBO J* 8: 365–370.
69. Qian S, Zhong X, Yu L, Ding B, de Haan P, et al. (2009) HIV-1 Tat RNA silencing suppressor activity is conserved across kingdoms and counteracts translational repression of HIV-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 605–610.
70. Mérai Z, Kerényi Z, Kertész S, Magna M, Lakatos L, et al. (2006) Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *J Virol* 80: 5747–5756.
71. Chao JA, Lee JH, Chapados BR, Deblor EW, Schneemann A, et al. (2005) Dual modes of RNA-silencing suppression by flock house virus protein B2. *Nat Struct Mol Biol* 12: 952–957.
72. van Rij RP, Saleh MC, Berry B, Foo C, Houk A, et al. (2006) The RNA silencing endonuclease Argonaute 2 mediates specific antiviral immunity in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev* 20: 2985–2995.
73. Schuetler E, Hemmes H, Huisman R, Goldbach R, Prins M, et al. (2010) Diverging affinity of tospovirus RNA silencing suppressor proteins, NSs, for various RNA duplex molecules. *J Virol* 84: 11542–11554.
74. Fenner BJ, Goh W, Kwang J (2006) Sequestration and protection of double-stranded RNA by the betanodavirus B2 protein. *J Virol* 80: 6822–6833.
75. Hemmes H, Lakatos L, Goldbach R, Burgan J, Prins M (2007) The NS3 protein of *Rice hoja blanca tenuivirus* suppresses RNA silencing in plant and insect hosts by efficiently binding both siRNAs and miRNAs. *RNA* 13: 1079–1089.
76. Lakatos L, Csorba T, Pantaleo V, Chapman EJ, Carrington JC, et al. (2006) Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J* 25: 2768–2780.
77. Vargason JM, Szitty G, Burgan J, Tanaka Hall TM (2003) Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. *Cell* 115: 799–811.
78. Ye K, Malinina L, Patel DJ (2003) Recognition of small interfering RNA by a viral suppressor of RNA silencing. *Nature* 426: 874–878.
79. Lingel A, Simon B, Izaurralde E, Sattler M (2005) The structure of the flock house virus B2 protein, a viral suppressor of RNA interference, shows a novel mode of double-stranded RNA recognition. *EMBO Rep* 6: 1149–1155.
80. Carbonell A, Dujovny G, Garcia JA, Valli A (2012) The *Cucumber vein yellowing virus* silencing suppressor P1b can functionally replace HC-Pro in *Plum pox virus* infection in a host-specific manner. *Mol Plant-Microbe Interact* 25: 151–164.
81. Garcia-Ruiz H, Takeda A, Chapman EJ, Sullivan CM, Fahlgren N, et al. (2010) *Arabidopsis* RNA-dependent RNA polymerases and dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during *Turnip mosaic virus* infection. *Plant Cell* 22: 481–496.
82. Maliogka V, Calvo M, Carbonell AT, Garcia JA, Valli AA (2012) Heterologous RNA silencing suppressors from both plant- and animal-infecting viruses support Plum pox virus infection. *J Gen Virol* 93: 1601–1611.
83. Lu R, Maduro M, Li F, Li HW, Broitman-Maduro G, et al. (2005) Animal virus replication and RNAi-mediated antiviral silencing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 436: 1040–1043.
84. Han YH, Luo YJ, Wu Q, Jovel J, Wang XH, et al. (2011) RNA-based immunity terminates viral infection in adult *Drosophila* in absence of viral suppression of RNAi: Characterization of viral siRNA populations in wildtype and mutant flies. *J Virol* 85: 13153–13163.
85. Blair CD (2011) Mosquito RNAi is the major innate immune pathway controlling arbovirus infection and transmission. *Future Microbiol* 6: 265–277.
86. Zambon RA, Vakharia VN, Wu LP (2006) RNAi is an antiviral immune response against a dsRNA virus in *Drosophila melanogaster*. *Cell Microbiol* 8: 880–889.
87. Fenner BJ, Thiagarajan R, Chua HK, Kwang J (2006) Betanodavirus B2 is an RNA interference antagonist that facilitates intracellular viral RNA accumulation. *J Virol* 80: 85–94.
88. Iwamoto T, Mise K, Takeda A, Okinaka Y, Mori K, et al. (2005) Characterization of Striped jack nervous necrosis virus subgenomic RNA3 and biological activities of its encoded protein B2. *J Gen Virol* 86: 2807–2816.
89. Cullen BR (2006) Is RNA interference involved in intrinsic antiviral immunity in mammals? *Nat Immunol* 7: 563–567.
90. Gottwein E, Mukherjee N, Sachse C, Frenzel C, Majoros WH, et al. (2007) A viral microRNA functions as an orthologue of cellular miR-155. *Nature* 450: 1096–U1017.
91. Gupta A, Gartner JJ, Sethupathy P, Hatzigeorgiou AG, Fraser NW (2006) Anti-apoptotic function of a microRNA encoded by the HSV-1 latency-associated transcript. *Nature* 442: 82–85.
92. Huang J, Wang F, Argyris E, Chen K, Liang Z, et al. (2007) Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4+ T lymphocytes. *Nat Med* 13: 1241–1247.
93. Otsuka M, Jing Q, Georgel P, New L, Chen J, et al. (2007) Hypersusceptibility to vesicular stomatitis virus infection in Dicer1-deficient mice is due to impaired miR24 and miR93 expression. *Immunity* 27: 123–134.
94. Pedersen IM, Cheng G, Wieland S, Volinia S, Croce CM, et al. (2007) Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism. *Nature* 449: 919–922.
95. Song L, Liu H, Gao S, Jiang W, Huang W (2010) Cellular microRNAs inhibit replication of the H1N1 influenza A virus in infected cells. *J Virol* 84: 8849–8860.

96. Van Stry M, Oguin T, Cheloufi S, Vogel P, Watanabe M, et al. (2012) Enhanced susceptibility to influenza A virus of Ago1/3 double null mice. *J Virol*.
97. Jopling CL, Yi MK, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P (2005) Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific microRNA. *Science* 309: 1577–1581.
98. Curtis MD, Grossniklaus U (2003) A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol* 133: 462–469.
99. Rohila JS, Chen M, Cerny R, Fromm ME (2004) Improved tandem affinity purification tag and methods for isolation of protein heterocomplexes from plants. *Plant J* 38: 172–181.
100. Haseloff J, Siemering KR, Prasher DC, Hodge S (1997) Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic Arabidopsis plants brightly. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 2122–2127.
101. Hamilton CM, Frary A, Lewis C, Tanksley SD (1996) Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9975–9979.
102. Schwach F, Vaistij FE, Jones L, Baulcombe DC (2005) An RNA-dependent RNA polymerase prevents meristem invasion by Potato Virus X and is required for the activity but not the production of a systemic silencing signal. *Plant Physiol* 138: 1842–1852.
103. Valli A, Martín-Hernández AM, López-Moya JJ, García JA (2006) RNA silencing suppression by a second copy of the P1 serine protease of *Cucumber vein yellowing ipomovirus* (CVYV), a member of the family *Potyviridae* that lacks the cysteine protease HCPro. *J Virol* 80: 10055–10063.
104. Fernández-Arias A, Martínez S, Rodríguez JF (1997) The major antigenic protein of infectious bursal disease virus, VP2, is an apoptotic inducer. *J Virol* 71: 8014–8018.

The Infectious Bursal Disease Virus RNA-Binding VP3 Polypeptide Inhibits PKR-Mediated Apoptosis

Idoia Busnadiego, Ana M. Maestre[‡], Dolores Rodríguez, José F. Rodríguez*

Department of Molecular and Cellular Biology, Centro Nacional de Biotecnología-CSIC, Cantoblanco, Madrid, Spain

Abstract

Infectious bursal disease virus (IBDV) is an avian pathogen responsible for an acute immunosuppressive disease that causes major losses to the poultry industry. Despite having a bipartite dsRNA genome, IBDV, as well as other members of the Birnaviridae family, possesses a single capsid layer formed by trimers of the VP2 capsid protein. The capsid encloses a ribonucleoprotein complex formed by the genome associated to the RNA-dependent RNA polymerase and the RNA-binding polypeptide VP3. A previous report evidenced that expression of the mature VP2 IBDV capsid polypeptide triggers a swift programmed cell death response in a wide variety of cell lines. The mechanism(s) underlying this effect remained unknown. Here, we show that VP2 expression in HeLa cells activates the double-stranded RNA (dsRNA)-dependent protein kinase (PKR), which in turn triggers the phosphorylation of the eukaryotic initiation factor 2 α (eIF2 α). This results in a strong blockade of protein synthesis and the activation of an apoptotic response which is efficiently blocked by coexpression of a dominant negative PKR polypeptide. Our results demonstrate that coexpression of the VP3 polypeptide precludes phosphorylation of both PKR and eIF2 α and the onset of programmed cell death induced by VP2 expression. A mutation blocking the capacity of VP3 to bind dsRNA also abolishes its capacity to prevent PKR activation and apoptosis. Further experiments showed that VP3 functionally replaces the host-range vaccinia virus (VACV) E3 protein, thus allowing the E3 deficient VACV deletion mutant WR Δ E3L to grow in non-permissive cell lines. According to results presented here, VP3 can be categorized along with other well characterized proteins such as VACV E3, avian reovirus sigmaA, and influenza virus NS1 as a virus-encoded dsRNA-binding polypeptide with antiapoptotic properties. Our results suggest that VP3 plays a central role in ensuring the viability of the IBDV replication cycle by preventing programmed cell death.

Citation: Busnadiego I, Maestre AM, Rodríguez D, Rodríguez JF (2012) The Infectious Bursal Disease Virus RNA-Binding VP3 Polypeptide Inhibits PKR-Mediated Apoptosis. PLoS ONE 7(10): e46768. doi:10.1371/journal.pone.0046768

Editor: Eric Jan, University of British Columbia, Canada

Received: May 15, 2012; **Accepted:** September 5, 2012; **Published:** October 9, 2012

Copyright: © 2012 Busnadiego et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness BIO2006-09407, BIO2009-12443, and AGL2011-24758 to JFR, and AGL2010-15495 to DR. IB was supported by an FPI fellowship from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: jfrodrig@cnb.csic.es

[‡] Current address: Department of Microbiology and The Global Health and Emerging Pathogens Institute, Mount Sinai School of Medicine, New York, New York, United States of America

Introduction

Virus replication entails a complex set of interactions between the host cell machinery and viral products that has the potential to alter cell homeostasis. Indeed, every step in virus replication is susceptible to activate proapoptotic signaling. Programmed cell death (PCD) is a mechanism designed to eliminate superfluous cells, but it also acts as a first line of defense to halt virus replication. Although as a general rule PCD is very efficient at lessening the production of viral progenies, in some cases it might also contribute to virus dissemination and pathogenicity. In accordance to its importance, viruses incorporate a wide variety of molecular devices intended to counteract and/or manipulate the host's PCD response [1].

Apoptosis is induced by the activation of a family of cysteine proteases generically known as caspases. Caspase activation is triggered by two different but interrelated pathways [2]. The intrinsic pathway, also known as mitochondrial pathway, is set off following the detection of different types of cellular stress by specific sensor proteins belonging to the BH3-only member of the Bcl-2 family. This results in the formation of the apoptosome that

prompts the activation of effector proteases, namely caspase-3 and -7 [3]. The extrinsic pathway is activated by ligation of receptors containing death domains located at the cell membrane. This leads to the formation of the death-induced signaling complex (DISC) that triggers the activation of the initiator caspase-8 [4]. In some cell types, caspase-8 activation triggers a direct activation of the caspase-3 and -7 effectors, whilst in others it requires the amplification of death signals through stimulation of the mitochondrial pathway via the Bid sensor protein, also a member of the Bcl-2 family [5].

The infectious bursal disease virus (IBDV) is the best characterized member of the *Birnaviridae* family that groups naked icosahedral viruses with bi-segmented double-stranded RNA (dsRNA) genomes [6]. IBDV infects different bird species and causes an acute immunosuppressive disease, known as IBD or Gumboro disease, that affects domestic chickens (*Gallus gallus*) and it is responsible for major economic losses to the poultry industry world-wide [7]. Chickens are highly susceptible to the infection between 3 and 6 weeks after hatching. The consensus is that, following the ingestion of virus-contaminated stuff, virus particles are taken up by resident gut macrophages, and then transported to

other tissues. After reaching the Fabricius bursa (FB), the main IBDV-target organ, the virus actively replicates in IgM-bearing B lymphocytes [8]. Infection results in a rapid depletion of the bursal B-cell population but other secondary lymphoid organs, such as the spleen, thymus and cecal tonsils, also become depleted [9]. The destruction of lymphocyte populations associated to the infection causes immune suppression and hampers the immunological maturation of infected birds [10].

IBDV possess a single capsid (T = 13L symmetry) formed by 260 trimers of the capsid polypeptide (VP2) [11]. The inner capsid space is occupied by a ribonucleoprotein complex (RNP) formed by the dsRNA genome wrapped up by the VP3 polypeptide and covalently linked to the VPg form of the VP1 RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), and by “free” VP1 molecules thought to act both as primer and polymerase during RNA transcription [12,13].

The IBDV genome is formed by two dsRNA segments (A and B) encoding a total of five mature proteins. Segment A (3.2 kb) harbors two largely overlapped open reading frames (ORF) (ORF A1 and A2, respectively). Segment A transcription generates a single bicistronic mRNA. ORF A1 encodes VP5, a small (17-kDa), non-structural (NS) polypeptide, dispensable for virus replication in cell culture, that has been shown to be directly associated to virus dissemination and virulence [14–17]. ORF A2 encodes a large (107 kDa) polypeptide that undergoes a co-translational self-proteolytic processing that releases three polypeptides, namely the precursor of the capsid protein (pVP2, 54 kDa), the protease (VP4, 25 kDa), and the multifunctional polypeptide VP3 (28 kDa) [18]. The C-terminal pVP2 domain is subsequently cleaved at three secondary targets by VP4, and finally processed by VP2 itself to render the mature VP2 polypeptide (38 kDa) [19,20]. Segment B (2.8 kb) contains a single ORF (ORF B) encoding the RdRp VP1 (97 kDa) polypeptide [21].

Studies carried out in IBDV-infected birds documented the presence of apoptotic signs in infected bursal lymphocytes as well as in cells lacking detectable levels of IBDV-encoded polypeptides. This observation suggests that in vivo IBDV indirectly induces apoptosis in uninfected bystander cells, and this might contribute to the fast depletion of B lymphocytes and the destruction of the FB and immunosuppression [22]. Characterization of the IBDV replication cycle in chicken embryo fibroblasts (CEF) evidenced that, in this cell type, IBDV triggers a PCD response during the late phase of virus replication, after the assembly of the virus progeny. Two IBDV-encoded polypeptides, namely VP5 and VP2, have been related to the induction and control of IBDV-induced apoptotic response. The role of VP5 remains unclear. VP5 was first described as playing an anti-apoptotic role during the initial stages of IBDV infection [23]. Two recent reports have described the ability of VP5 to interact with the voltage-dependent anion channel 2 polypeptide (VDAC2) [24] and with p85 α subunit of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) [25], respectively. According to these reports, the interaction of VP5 with VDAC2 promotes PCD and restricts virus replication, whilst its interaction with the PI3K p85 α subunit suppresses premature apoptosis and enhances virus progeny yields. Regarding VP2, it has been shown that cells expressing the VP2 ORF in the absence of other virus genes using either vaccinia virus (VACV) or plasmid-based eukaryotic expression vectors, undergo a vigorous shut off of protein synthesis followed by PCD in a variety of cell lines [26]. This observation contrasts with the finding that expression of the complete IBDV polyprotein gene, that includes the VP2 coding region, leads to an efficient accumulation of polyprotein-derived products and the assembly of virus-like particles in the absence of a detectable PCD response [27]. The molecular mechanisms

responsible for both the PCD induction observed in VP2-expressing cells and the differential outcome observed in cells expressing VP2 and the polyprotein genes remained unknown. Results described in this report demonstrate that VP2 expression induces the activation of the dsRNA-dependent protein kinase (PKR)-mediated PCD response, and that this effect is efficiently blocked by coexpression of the IBDV RNA binding VP3 polypeptide.

VACV encodes a battery of polypeptides involved in the control of antiviral innate host responses [28,29]. One of these proteins, E3, is a dsRNA-binding polypeptide responsible for the inhibition of interferon (IFN)-induced pathways. E3 sequesters dsRNA molecules generated during the VACV replication process and prevents the activation of two IFN-inducible enzymes: PKR, responsible for the phosphorylation of the alpha subunit of the eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2 α) and the subsequent shut off of protein synthesis; and 2'-5'-oligoadenylate synthetase (2'-5'OAS) that triggers the activation of RNase L which in turn degrades both cellular and viral RNAs [30]. Elimination of the E3L gene from the VACV genome causes a major restriction in the range of cell lines supporting a productive VACV infection [31]. Here we show that VP3 functionally replaces in vitro the VACV dsRNA-binding E3 protein. Data described here suggest that the VP3 polypeptide plays an important role in counteracting IBDV-induced innate antiviral host cell responses.

Materials and Methods

Cells, viruses, infections, and transfections

HeLa (human epithelial cervical cancer cells, ATCC number CCL-2TM), DF-1 (spontaneously transformed chicken embryo fibroblasts, ATCC number CRL-12203), and BSC40 (African green monkey kidney cells, ATCC number CRL-2761) were grown in Dulbecco's modified minimal essential medium (DMEM) supplemented with penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 mg/ml) and 10% fetal calf serum (FCS) (Sigma). VACV VT7LacOI (referred here as VT7 for simplicity, was kindly provided by B. Moss. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) [32], VT7/VP2 [26], VT7/VP3 [26], VT7/VP3P1, the Western reserve strain (WR) [33], and WR/PKR-NP [34] (kindly provided by M. Esteban. Centro Nacional de Biotecnología. CSIC. Madrid. Spain) were grown and titrated in BSC40 cells. VACV WRAE3L [35] (kindly provided by B. Jacobs, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA) and WRAE3L/VP3 were grown and titrated in DF-1 cells. All VACV were purified through two consecutive 45% (w/v) sucrose cushions, and titrated in triplicate by plaque assay. Infections were performed on confluent ($\approx 75\%$) cell monolayers. Cultures were mock-infected or infected with the different viruses diluted in DMEM to the indicated multiplicity of infection (MOI). After 1 h of adsorption at 37°C the medium was removed and replaced with fresh DMEM supplemented with 2% FCS. The expression of isopropyl β -D-thiogalactosidase (IPTG)-inducible genes was triggered by adding IPTG (Apollo Scientific), 1 mM final concentration, to cell culture medium immediately after virus adsorption. Infected cells were incubated at 37°C until the specified times post-infection (p.i.). Transfections were performed with lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) on pre-confluent (80%) HeLa cell monolayers using a plasmid concentration of 100 ng per 10^5 cells.

Construction of recombinant VACV

To construct VT7/VP3P1, a DNA fragment of 789 bp containing the VP3MutPatch1 mutant version of the VP3 ORF,

containing four amino acid substitutions (K99D, R102D, K105D and K106D), flanked by NdeI and BamHI restriction sites, was generated by PCR using plasmid pFBhisVP3Patch1 (unpublished results) as template and the primers 5'GCGCCATATGGCTGCATCAGAGTTCAAAGAG and 5'GCGCGGATCCTCACTCAAGGTCCTCATCAGAG. The resulting PCR product was purified, digested with NdeI and BamHI and ligated to pVOTE.2 [32] previously digested with the same restriction enzymes. The resulting plasmid vector, pVOTE/VP3P1, was subjected to nucleotide sequencing to assess the correctness of the inserted sequence, and then used to generate the VACV VT7/VP3P1 via homologous recombination between the plasmid vector and the genome of the parental VT7 VACV. For this, BSC40 cells were infected with VT7 [32] and transfected with pVOTE/VP3P1. Selection and amplification of VT7/VP3P1 were carried out in BSC40 cells following a previously described protocol [32].

Construction of WRΔE3L/VP3 was initiated by producing a PCR-derived DNA fragment of 789 bp containing the VP3 ORF flanked by KpnI and BamHI restriction sites. The PCR reaction was carried out using the previously described pcDNA3-POLY plasmid [19] as template and oligonucleotides 5'GCGCGGTACCATGGCTGCATCAGAGTTCAAAGAG and 5'GCGCGGATCCTCACTCAAGGTCCTCATCAGAG as primers. After purification, the DNA fragment was subjected to restriction with KpnI and BamHI and ligated to the transfer plasmid vector pJR101 [36]. The resulting vector, pJR101/VP3, contains an insertion cassette formed by the VP3 ORF placed under the transcriptional control of the synthetic early/late Pse/1 VACV promoter, and the *E. coli* β-glucuronidase selection marker gene controlled by the P7.5 early/late promoter. The insertion cassette is flanked by sequences corresponding to the VACV hemagglutinin (HA) coding gene (A56R gene). pJR101/VP3 was subjected to nucleotide sequencing to assess the correctness of the inserted sequence and then used to transfect DF-1 cell monolayers previously infected with the parental virus WRΔE3L. The selection and amplification of WRΔE3L/VP3 was performed in DF-1 cells as previously described [36].

Construction of pcDNA-VP3

A DNA fragment corresponding to the VP3 coding region was generated by PCR from pVOTE.1/VP3 [26] using the primers 5'-CGCGAAGCTTATGGGTTTCCCTCACAATCCACGC and 5'-GCGCGGATCCTCACTCAAGGTCCTCATCAGAGAC. The resulting fragment contains an artificial ATG codon to allow for initiation of translation. The DNA fragment was purified, restricted with HindIII and BamHI and cloned into pcDNA3 (Invitrogen) previously digested with the same enzymes. The resulting plasmid, pcDNA-VP3, was subjected to nucleotide sequence analysis to assess the correctness of the cloned sequence.

Determination of caspase 3/7 activation

Determinations were carried out using the Caspase-Glo 3/7 assay kit (Promega) following the protocol recommended by the supplier. Briefly, HeLa cell monolayers grown in 96 well plates were infected at the indicated MOI. At the specified times p.i., 100 μl of Caspase-Glo 3/7 reagent was added to the wells under study. Plates were gently shaken and then incubated in the dark at 20°C for 60 min before recording the luciferase activity using an Orion microplate luminometer (Berthold technologies).

Autoradiography and Western blot analysis

For metabolic labeling cell monolayers were washed twice with methionine-free DMEM. Thereafter, cultures were incubated for 30 min with 100 μCi/ml of [³⁵S]methionine, washed twice with

PBS, and resuspended in Laemmli's sample buffer (62.5 mM Tris-HCl [pH 6.8]; 2% sodium dodecyl sulfate [SDS]; 0.25% bromophenol blue; 5% glycerol; and 5% β-mercaptoethanol). Protein samples were subjected to 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), fixed, and dried. Radioactive signals were detected with a Storm gel imaging system (Molecular Dynamics).

Samples used for Western blot (WB) analysis were prepared by removing media from cell monolayers and resuspending the cells in iced-chilled disruption buffer (0.5% Triton X-100; 50 mM KCl; 50 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl [pH 7.5]; 1 mM EDTA, 10% glycerol; Complete protease inhibitor cocktail [Roche]; 25 mM β-glycerophosphate; 1 mM Na₃VO₄). Cell lysates were mixed (v/v) with 2× Laemmli's sample buffer. Electrophoreses were performed in 12% SDS-PAGE, followed by electroblotting onto nitrocellulose membranes. Immunoblots were blocked for 1 h in PBS containing 0.05% Tween 20 (PBST) and 5% non-fat dry milk, washed in PBST, and incubated at 4°C overnight with the different primary antibodies in PBST containing 1% non-fat dry milk. Antibodies used in this study were rabbit polyclonal sera specific for IBDV VP2 [27] and VP3 [27], VACV D13 [37], pT451 PKR (Invitrogen), total eIF2α (Santa Cruz Biotechnology), pS52 eIF2α (Invitrogen), respectively, and mouse monoclonals specific for VACV E3 (a generous gift from B. Jacobs, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA), β-actin (Sigma), and total PKR (Santa Cruz Biotechnology). After incubation with primary antibodies, membranes were incubated with either goat anti-rabbit IgG-Peroxidase conjugate (Sigma) or goat anti-mouse IgG-Peroxidase conjugate (Sigma), and immunoreactive bands detected by enhanced chemiluminescence reaction (GE Healthcare). Blocking and primary antibody incubation for total eIF-2α, pS52 eIF-2α, total PKR, and pT451 PKR were performed according to instructions provided by the manufacturer.

Results

VP2 expression leads to PKR and eIF2α phosphorylation

We have previously shown that VP2 expression induces a potent shut off of protein synthesis that is followed by a PCD response [26]. The molecular basis underlying this effect remained unknown. To gain insight about this phenomenon we used a previously described recombinant VACV, VT7/VP2, that expresses the VP2 polypeptide upon addition to the cell culture medium of the inducer IPTG [32]. HeLa cell monolayers were infected with either VT7, the parental virus used to generate VT7/VP2, or with VT7/VP2 at a MOI of 2 plaque-forming units per cell (PFU/cell) and maintained in medium supplemented or not with IPTG. At 24 h p.i. the apoptotic response induced by these two viruses was measured by analyzing the activation of the effector caspases 3 and 7 using the caspase-Glo 3/7 assay kit that is based on the release of luciferase substrate mediated by the specific activity of caspases 3 and 7. Basal caspase activation levels were determined using mock-infected cells maintained in the absence of IPTG. As shown in Fig. 1A, in cultures infected with the parental VT7 VACV the addition of IPTG to the cell medium caused a moderate increase (less than 1.5 fold) on the caspase activation levels. This observation sharply contrasts with data gathered with cultures infected with VT7/VP2. In this case, addition of IPTG triggered a significant increase (≈4 fold) on the caspase activation levels with respect to those observed in its corresponding IPTG-untreated control.

To analyze in more detail the effect of VP2 expression on cell fate, two sets of HeLa cell cultures were infected with this virus (2 PFU/cell) and maintained in medium supplemented with

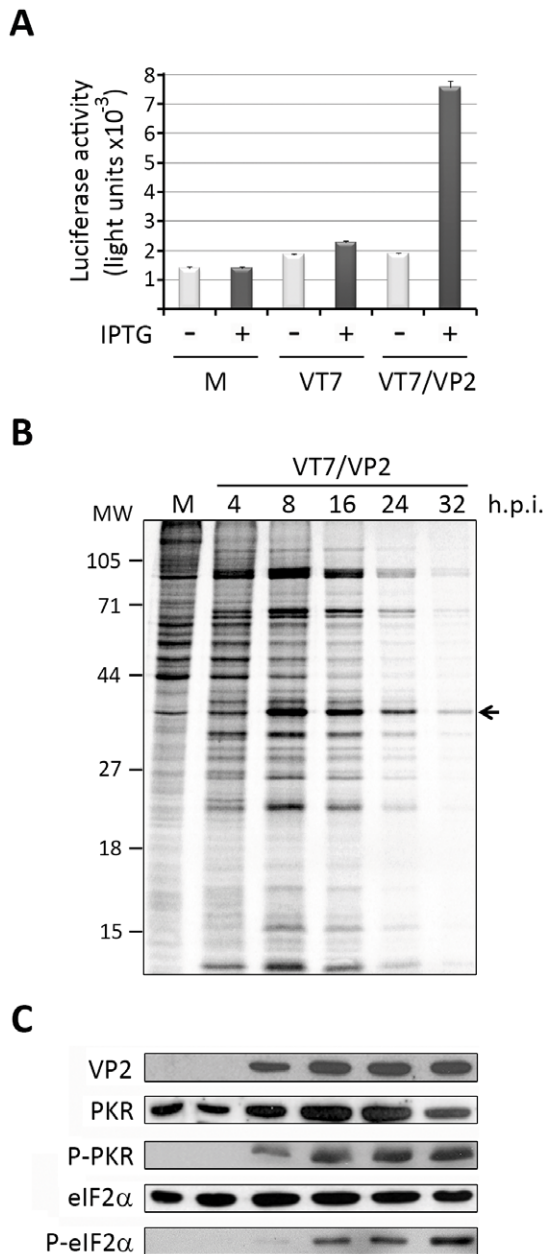


Figure 1. Characterization of cell responses triggered by VP2 expression in HeLa cells. **A. Induction of apoptosis.** Cell monolayers were mock-infected (M) or infected (MOI 2 PFU/cell) with the VT7 or VT7/VP2 viruses. After infection, cultures were maintained in the absence (–) or presence (+) of the inducer IPTG. Apoptosis was measured using the Caspase-Glo 3/7 assay kit at 24 h.p.i. Each determination was carried out in triplicate. Presented data correspond to the mean \pm the standard deviation of three independent experiments. **B. Host cell protein synthesis.** The panel shows an autoradiography corresponding to a time-course analysis carried out in IPTG-induced VT7/VP2-infected HeLa cells. At the indicated times (h.p.i.) cells were metabolically labeled with [³⁵S]methionine. A mock-infected culture (M) was used as an internal control. Cell extracts were subjected to SDS-PAGE and autoradiography. The position of molecular mass markers is indicated (MW). The band corresponding to the VP2 polypeptide is indicated by an arrow. **C. PKR and eIF2α phosphorylation.** Total cell extracts from mock- or VT7/VP2-infected cells collected at the times p.i. (h.p.i.) indicated in panel B were subjected to SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, and immunoblotted with serum anti-VP2, -PKR, -pT451 PKR, -eIF2α, or -pS52 eIF2α. The WB corresponding to eIF2α was used as protein loading control. doi:10.1371/journal.pone.0046768.g001

IPTG. IPTG-treated uninfected cells were used as a control for this experiment. The first culture set was used to assess the kinetics of protein synthesis. For this, at different times p.i., ranging from 4 to 32 h, cells were metabolically labeled with [³⁵S]methionine for 30 min, and the corresponding samples subjected to SDS-PAGE followed by autoradiography (Fig. 1B). The second culture set was used to assess the status of selected polypeptides by WB analysis (Fig. 1C).

In agreement to previously reported data [26], we observed that cells expressing VP2 undergo a potent shut off of protein synthesis evidenced by the steady reduction of [³⁵S]methionine incorporation detected in samples collected from 16 h.p.i. onwards (Fig. 1B). The WB analysis performed with the VP2-specific serum shows that VP2 accumulation is already detectable at 8 h.p.i., and reaches its maximum level at 16 h.p.i. (Fig. 1C). In addition to the described biochemical changes, cells expressing VP2 exhibited noticeable morphological alterations, e.g. cell shrinkage and membrane blebbing, typically found in apoptotic cells (data not shown).

One of the most common causes for the inhibition of protein synthesis in virus-infected cells is the phosphorylation of eIF2α [38]. Hence, we analyzed the extent of eIF2α phosphorylation in VP2-expressing cells. As shown in Fig. 1C, whilst the level of total eIF2α remains roughly constant throughout the duration of the experiment, the presence of phosphorylated eIF2α (P-eIF2α), first noticeable as a very faint band in samples collected at 8 h.p.i., increases with time, thus somehow matching the VP2 expression profile. It has been shown that eIF2α can be phosphorylated by four mammalian serine-threonine protein kinases, namely PKR, general non-repressible 2 kinase (GCN2), PKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK), and hemin-regulated inhibitor of translation (HRI), following diverse stress conditions [39–42]. In particular, PKR has been shown to be a chief contender in the defensive host cell responses against a wide variety of viruses [43]. Consequently, we decided to analyze whether the presence of phosphorylated eIF2α (P-eIF2α) in cells expressing VP2 might be paralleled by the accumulation of phosphorylated PKR (P-PKR). Results presented in Fig. 1C show that, in line to what had been observed with the eIF2α polypeptide, the presence of P-PKR, already detectable in samples harvested at 8 h.p.i., reaches a maximum intensity level from 16 to 32 h.p.i. As expected, no significant variations were observed in the total content of PKR throughout the duration of the infection. The results of this analysis indicate that the blockade of protein synthesis and the PCD response observed in cells expressing the VP2 polypeptide could be initially triggered by phosphorylation of PKR.

Expression of a dominant-negative version of PKR prevents VP2-induced protein synthesis arrest and PCD

Results described above strongly suggested that the protein synthesis blockade and the PCD response observed in cells expressing VP2 might be the result of eIF2α phosphorylation triggered by activated PKR. To test this hypothesis we took advantage of the previously described recombinant WR/PKR-NP generated using the WR strain of VACV as parental virus [34]. Upon IPTG addition to the cell medium, WR/PKR-NP expresses a dominant negative mutant form of the PKR polypeptide containing a single amino acid substitution (K269R) that is unable to phosphorylate eIF2α. To examine the role of PKR phosphorylation in the arrest of protein synthesis and the PCD response observed in VP2 expressing cells, HeLa monolayers were coinfecting either with VT7/VP2+WR or VT7/VP2+WR/PKR-NP and maintained in the presence or absence of IPTG for 24 h. These cultures were used to assess the level of caspase 3/7

activation, the status of protein synthesis, and the comparative accumulation of relevant polypeptides.

As shown in Fig. 2A, coinfection with WR does not significantly alter the level of caspase 3/7 activation induced by VP2 expression compared with that observed in cells infected with VT7/VP2 alone (Fig. 1A). In contrast, coinfection with WR/PKR-NP results in a major reduction of caspase 3/7 activation (Fig. 2A). A similar effect was observed concerning the impact of VP2 on protein synthesis. Whilst coinfection with WR does not cause a noticeable effect on the shut off of protein synthesis observed in cells expressing VP2, cells coinfecting with VT7/VP2+WR/PKR-NP show protein synthesis levels similar to those observed in uninduced cells infected with VT7/VP2 (Fig. 2B). The arrest of protein synthesis observed in samples corresponding to cells coinfecting with VT7/VP2+WR and maintained in the presence of IPTG was accompanied by the presence of VP2 and a conspicuous accumulation of P-PKR and P-eIF2 α (Fig. 2C). IPTG-induced cultures coinfecting with VT7/VP2+WR/PKR-NP accumulated a comparatively higher amount of the VP2 polypeptide but showed a barely detectable P-PKR level. Additionally, the presence of P-eIF2 α was not detectable in these cultures. As expected, whilst the amount of total eIF2 α was similar in all analyzed cell extracts, the amount of total PKR was noticeable enriched in extracts from IPTG-induced cells coinfecting with VT7/VP2+WR/PKR-NP (Fig. 2C).

Results presented in this section demonstrate that the arrest of protein synthesis and the PCD response observed in HeLa cells expressing the VP2 polypeptide are efficiently counteracted by the expression of a dominant negative form of PKR. The presence of this polypeptide largely precludes the VP2-induced phosphorylation of PKR and completely prevents the subsequent phosphorylation of eIF2 α , thus pointing the PKR phosphorylation observed in VP2-expressing cells as the leading cause of the activation of a PCD response.

Coexpression of the IBDV VP3 polypeptide prevents VP2-induced protein synthesis arrest and PCD

Data described above demonstrates that VP2 expression triggers PKR activation and the phosphorylation of eIF2 α , hence leading to a blockade of protein synthesis and PCD. This observation sharply contrasts with results obtained when expressing the IBDV polyprotein using the same expression system. The expression of the polyprotein gene using VT7/Poly, a recombinant VACV generated by inserting the polyprotein gene into the genome of the VT7 vector, leads to a rather efficient accumulation of polyprotein-derived polypeptides in the absence of a PCD response [27]. This observation suggested the possibility that the effects prompted by VP2 expression might be counteracted by other polyprotein-derived product. Likewise other well characterized virus-encoded proteins capable of preventing PKR activation, e.g. VACV E3 [34], avian reovirus sigmaA [44] or influenza virus NS1 [45], VP3 efficiently binds dsRNA in a non-specific manner [46].

In view of the results described above, we considered the VP3 polypeptide as a likely candidate to prevent VP2-mediated PKR activation. To analyze this hypothesis we used a previously described recombinant VACV, VT7/VP3, that expresses the IBDV VP3 polypeptide in the presence of IPTG [26]. As control for the experiments described below, we used the VT7 virus, the VACV employed as a parental virus for the generation of the VT7/VP2 and VT7/VP3 recombinant viruses. VT7 carries all the foreign genetic regulatory elements present in both VT7/VP2 and VT7/VP3. A series of single and double infections were carried out with VT7, VT7/VP2 and VT7/VP3 viruses.

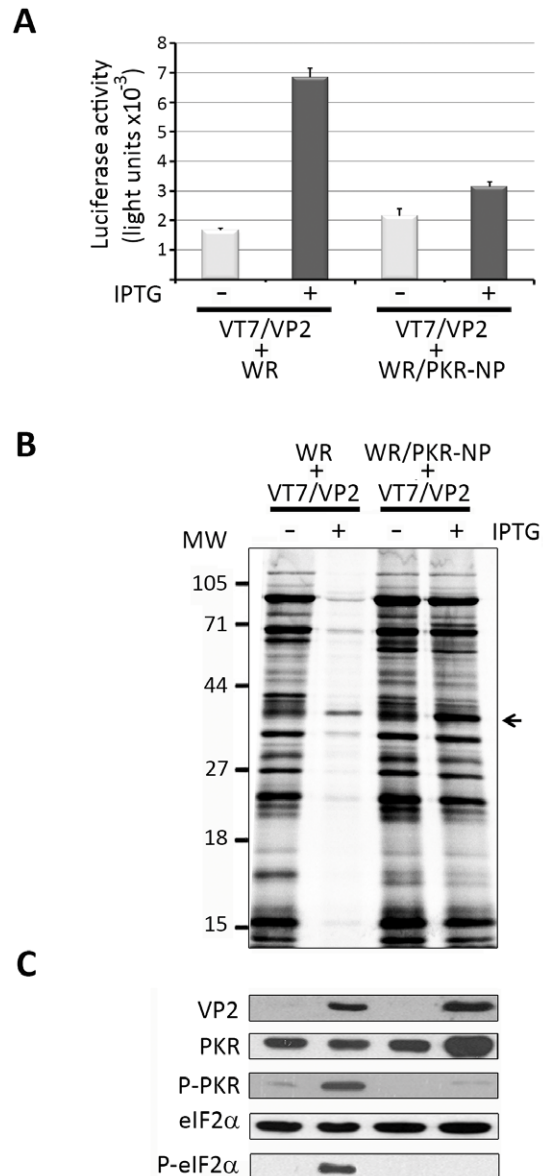


Figure 2. Effect of the expression of a dominant negative PKR on VP2-induced cell responses. A. Induction of apoptosis. Cell monolayers were coinfecting with VT7/VP2+WR or VT7/VP2+WR/PKR-NP (2 PFU/cell of each virus) and maintained in the absence (–) or presence (+) of the inducer IPTG. Apoptosis was measured using the Caspase-Glo 3/7 assay kit at 24 h.p.i. Each determination was carried in triplicate. Presented data correspond to the mean \pm the standard deviation of three independent experiments. **B. Host cell protein synthesis.** The panel shows an autoradiography corresponding to the protein synthesis profiles obtained from cells infected with VT7/VP2+WR or VT7/VP2+WR/PKR-NP that were maintained in the absence (–) or presence (+) of IPTG and metabolically labeled with [35 S]methionine at 24 h.p.i. Cell extracts were subjected to SDS-PAGE and autoradiography. The position of molecular mass markers is indicated in triplicate. The radioactive band corresponding to the VP2 polypeptide is indicated by an arrow. **C. PKR and eIF2 α phosphorylation.** Total extracts from cells infected with VT7/VP2+WR or VT7/VP2+WR/PKR-NP, maintained in the absence (–) or presence (+) of IPTG, were collected at for 24 h.p.i. Extracts were subjected to SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, and immunoblotted with serum anti-VP2, -PKR, -pT451 PKR, -eIF2 α , or -pS52 eIF2 α . The WB corresponding to eIF2 α was used as protein loading control.

doi:10.1371/journal.pone.0046768.g002

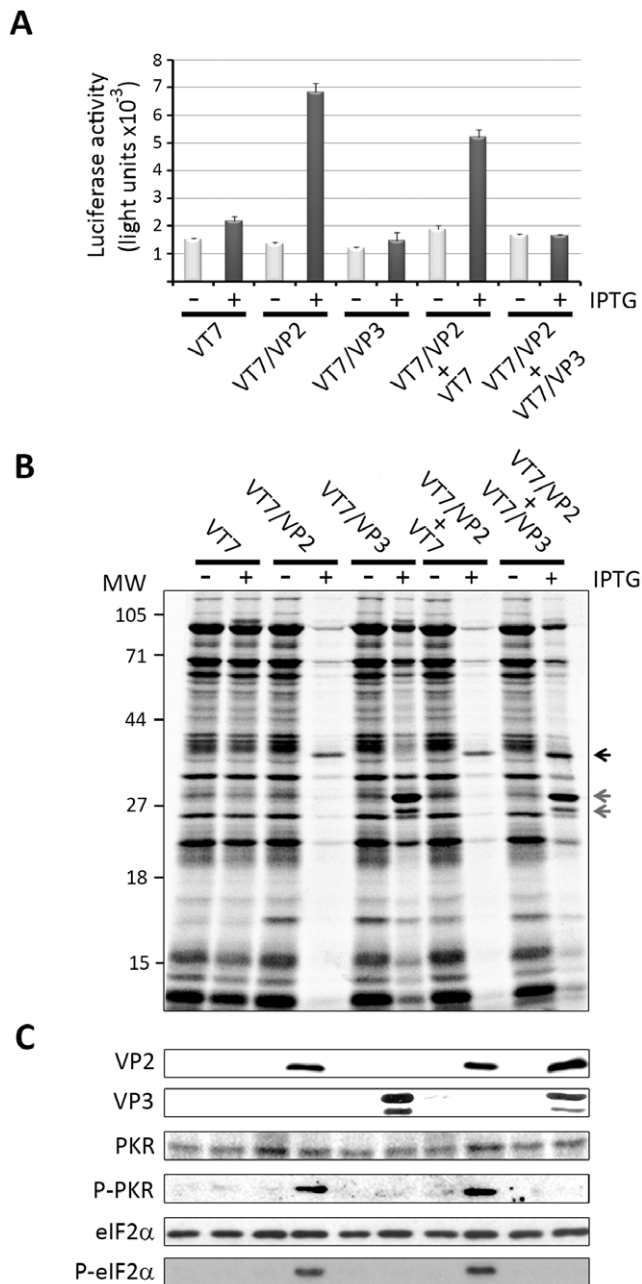


Figure 3. The expression of the IBDV VP3 polypeptide counteracts VP2-induced cell responses. A. Induction of apoptosis. Cell monolayers were infected with VT7, VT7/VP2 or VT7/VP3, or coinfecting with VT7+VT7/VP2 or VT7/VP3+VT7/VP2 (2 PFU/cell of each virus) and maintained in the absence (–) or presence (+) of the inducer IPTG. Apoptosis was measured using the Caspase-Glo 3/7 assay kit at 24 h.p.i. Each determination was carried in triplicate. Presented data correspond to the mean \pm the standard deviation of three independent experiments. **B. Host cell protein synthesis.** The panel shows an autoradiography corresponding the protein synthesis profiles obtained from cells infected with VT7, VT7/VP2 or VT7/VP3, or coinfecting with VT7+VT7/VP2 or VT7/VP3+VT7/VP2. Cultures were maintained in the absence (–) or presence (+) of IPTG. At 24 h.p.i. cells were metabolically labeled with [35 S]methionine. Cell extracts were subjected to SDS-PAGE and autoradiography. The position of molecular mass markers is indicated (MW). Arrows indicate the position of bands corresponding to the VP2 polypeptide (black) and VP3 (grey). **C. PKR and eIF2α phosphorylation.** Total extracts from cells infected with VT7, VT7/VP2 or VT7/VP3, or coinfecting with VT7+VT7/VP2 or VT7/

VP3+VT7/VP2, maintained in the absence (–) or presence (+) of IPTG, were harvested at 24 h.p.i. Extracts were subjected to SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, and immunoblotted with serum anti-VP2, -VP3, -PKR, -pT451 PKR, -eIF2α, or -pS52 eIF2α. The WB corresponding to eIF2α was used as protein loading control.
doi:10.1371/journal.pone.0046768.g003

Infections were performed with 2 PFU/cell of each virus, and thereafter cultures were maintained in the absence or presence of IPTG for 24 h. Three cell sets were used in order to assess the level of caspase 3/7 activation, protein synthesis, and the comparative accumulation of relevant polypeptides.

As expected from data presented above, the addition of IPTG to cultures infected with VT7/VP2 either alone or coinfecting with the parental VT7 virus triggered a notorious apoptotic response (Fig. 3A). However, the level of caspase 3/7 activation detected in IPTG-induced cells coinfecting with VT7/VP2 and VT7/VP3 were similar to those found in uninduced cultures. The activation levels found in cells coinfecting with VT7/VP2 and VT7/VP3 were akin to those found after infection with either the parental VT7 or the VT7/VP3 viruses. In line with these observations, a clear arrest of protein synthesis was detected exclusively in IPTG-induced cultures infected with VT7/VP2 alone or coinfecting with VT7 (Fig. 3B). As expected, the shut off of protein synthesis was accompanied by a prominent accumulation of both P-PKR and P-eIF2α (Fig. 3C). In a sharp contrast, cells infected with VT7/VP2+VT7/VP3, simultaneously expressing the VP2 and VP3 polypeptides, exhibited similar protein synthesis rates to those found in IPTG-induced cells infected with either the parental virus VT7 or the recombinant VT7/VP3 (Fig. 3B). Consistent with the preservation of normal levels of protein synthesis, extracts from cells simultaneously expressing the VP2 and VP3 polypeptides (Fig. 3B, C) contained undetectable levels of P-PKR and P-eIF2α (Fig. 3C). As shown before [26], VP3 overexpression gives rise to accumulation of a protein doublet formed by a major band of the expected SDS-PAGE mobility along with a faint band with a slightly faster mobility.

We have previously shown that VP2 expression triggers a PCD response when transiently expressed from eukaryotic expression vectors [26]. It was therefore interesting to determine whether the expression of VP3 might also counteract the VP2-mediated PCD response in the absence of exogenous VACV contributions. For this, HeLa cell monolayers were transfected with pcDNA-VP2 or pcDNA-VP3, expressing the VP2 and VP3 polypeptides, respectively or cotransfected with pcDNA-VP2 and pcDNA-VP3. As controls for these experiments, cells were either mock-transfected or transfected with the parental pcDNA3 plasmid. After transfection, cells were maintained for 48 h. and then used to determine the level of caspase 3/7 activation, and the accumulation of relevant polypeptides. As shown in Fig. 4A, whilst cultures transfected with pcDNA3 or pcDNA-VP3 showed caspase activation levels slightly higher than those detected in mock-transfected cells, monolayers transfected with the VP2-expressing plasmid, pcDNA-VP2, exhibited an increase of ca. 10-fold with respect to untransfected control cells. In line with previous observations, VP3 coexpression resulted in a clear reduction on the level of caspase 3/7 activation with respect to those observed in cells overexpressing VP2. These results are in good agreement with the corresponding WB data (Fig. 4B) showing that transfection with pcDNA-VP2 triggers a conspicuous accumulation of P-PKR which is greatly attenuated in cells cotransfected with pcDNA-VP3.

Taken together these results demonstrate that VP3 effectively prevents the PCD response triggered by the VP2 protein

regardless of whether the proteins are expressed from VACV- or plasmid-based vectors, and that this effect is directly associated to the blockade of PKR phosphorylation.

The VP3 dsRNA-binding domain is necessary for its ability to control the VP2-induced PKR activation and PCD response

We have recently mapped the position of a positively charged region located at the surface of the VP3 dimer which is essential for dsRNA binding. This region, termed Patch1, contains four positively charged residues (K99, R102, K105 and K106). We have shown that substitution of positively charged K and R residues for negatively charged D residues (K99D, R102D, K105D and K106D) within the Patch1 region results in the generation of a mutant VP3 version, VP3MutPatch1, lacking the ability to bind dsRNA (unpublished results). We sought to determine whether the capacity of VP3 to counteract the effects triggered by VP2 expression was linked to its ability to bind dsRNA. A recombinant VACV, VT7/VP3P1, was generated and used to perform a comparative analysis of the ability of wild type VP3 and VP3MutPatch1 to prevent cell responses associated to VP2 expression.

Three sets of cells were coinfecting with VT7/VP2+VT7, VT7/VP2+VT7/VP3, or VT7/VP2+VT7/VP3P1, at a MOI of 2 PFU/cell of each virus, and maintained either in the presence or absence of IPTG. At 24 h.p.i. infected cell cultures were used to assess the induction of PCD, the status of protein synthesis and the presence of VP2, VP3, and total and P-PKR. As shown in Fig. 5A, whilst the expression of the wild type VP3 polypeptide efficiently prevents the activation of caspases 3 and 7 triggered by VP2 expression, the mutant VP3MutPatch1 protein is not able of preventing this effect. In line with this finding, IPTG-induced cells coinfecting with VT7/VP2+VT7/VP3P1 showed a blockade of protein synthesis akin to that observed in cells coinfecting with VT7/VP2+VT7 (Fig. 5B). The results of the WB analysis confirmed the correct expression of the VP3MutPatch1 polypeptide, and showed that the synthesis of this mutant polypeptide does not prevent the accumulation of P-PKR in cells expressing VP2 (Fig. 5C). As observed in Fig. 5B and C, the VP3MutPatch1 mutant polypeptide exhibits a slightly slower SDS-PAGE migration than its wild type counterpart. These results show that the described anti-apoptotic activity of VP3 is dependent upon the presence of a functional Patch1 dsRNA-binding domain.

The IBDV VP3 polypeptide rescues the ability of the VACV WRΔE3L deletion mutant to replicate in HeLa cells

It has been shown that the deletion mutant WRΔE3L derived from the VACV WR strain, lacking the E3L gene encoding the E3 polypeptide, is unable to replicate in IFN-competent cell lines including HeLa cells [47]. Interestingly, the insertion of some recombinant genes encoding dsRNA binding proteins from different viruses, e.g. influenza NS1 [45], avian reovirus sigmaA [44], and porcine rotavirus NSP3 [48], into the genome of WRΔE3L leads to the generation of recombinant VACV viruses capable of overcoming the host cell restriction imposed by the lack of the E3L gene.

Results described above evoked the possibility that the IBDV VP3 polypeptide might functionally replace E3. To test this hypothesis, the VP3 ORF was cloned into the pJR101 VACV insertion/expression plasmid vector under the control of a synthetic early/late VACV promoter. The resulting plasmid, pJR101/VP3, was used generate the recombinant VACV WRΔE3L/VP3 by transfection of WRΔE3L-infected DF1 cells.

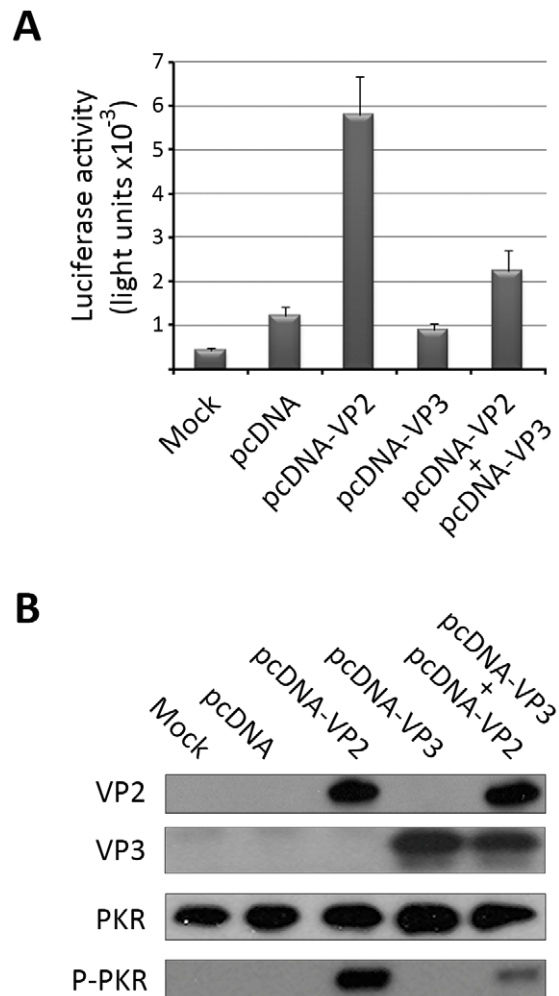


Figure 4. The IBDV VP3 polypeptide counteracts VP2-induced cell responses when expressed from an eukaryotic plasmid expression vector. A. Induction of apoptosis. Cell monolayers were mock-transfected, transfected with pcDNA3, pcDNA-VP2, pcDNA-VP3, or cotransfected with pcDNA-VP2 and pcDNA-VP3. Apoptosis was measured using the Caspase-Glo 3/7 assay kit at 48 h. post-transfection. Each determination was carried in triplicate. Presented data correspond to the mean \pm the standard deviation of three independent experiments. **B. PKR phosphorylation.** Total extracts from cells mock-transfected, transfected with pcDNA3, pcDNA-VP2, pcDNA-VP3, or cotransfected with pcDNA-VP2 and pcDNA-VP3 were harvested at 48 h. post-transfection. Extracts were subjected to SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, and immunoblotted with serum anti-VP2, -VP3, -PKR, or -pT451 PKR. The WB corresponding to PKR was used as protein loading control. doi:10.1371/journal.pone.0046768.g004

The DF1 cells are immortalized chicken embryo fibroblasts permissive for WRΔE3L replication. As described in the materials and methods section, the WRΔE3L/VP3 recombinant virus expressing the VP3 polypeptide was generated, selected, grown and titrated in DF-1 cells. In order to characterize the ability of the VP3 polypeptide to overcome the blockade of protein synthesis resulting from the absence of the E3L gene in a non-permissive cell line, HeLa cell cultures were infected (MOI 5 PFU/cell) with WRΔE3L/VP3. As controls for this experiment HeLa cells were also infected with either wild type WR, containing the E3L gene, or with the deletion mutant WRΔE3L. At 8 and 24 h.p.i., cells were either subjected to metabolic labeling with [³⁵S]methionine to analyze the protein synthesis rate, or collected for WB analysis.

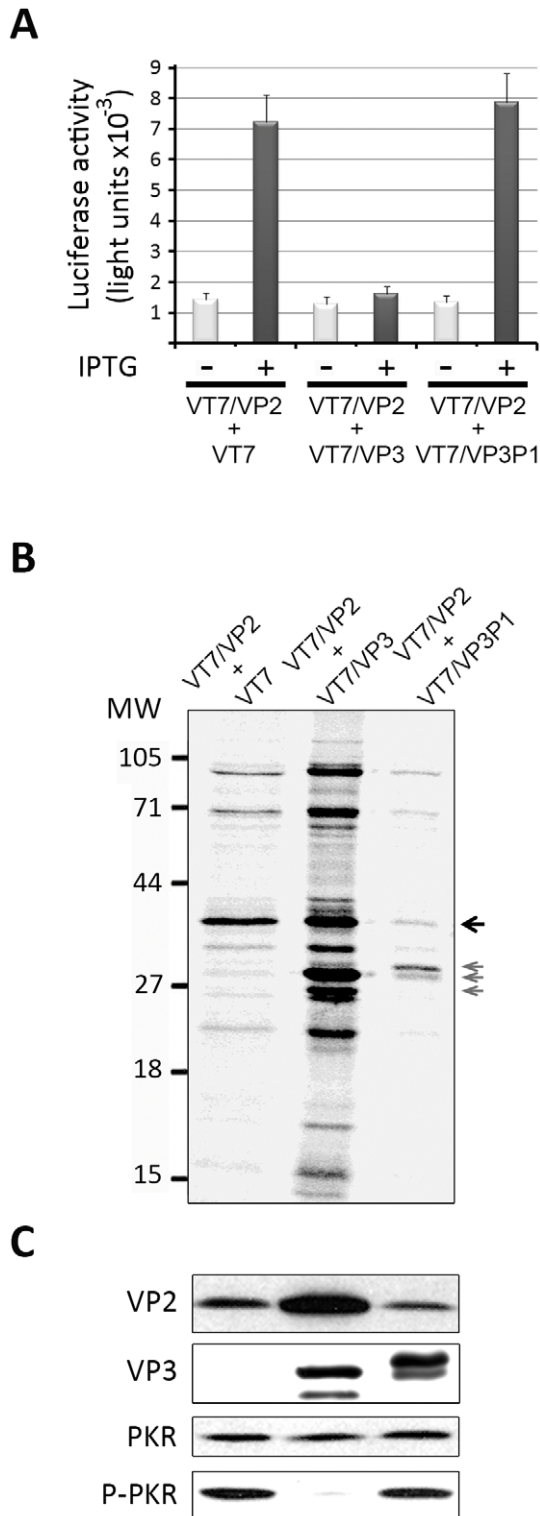


Figure 5. Elimination of the VP3 dsRNA-binding domain abrogates its ability to counteract VP2-induced cell responses. **A. Induction of apoptosis.** HeLa cell monolayers were infected with VT7/VP2 and coinfecting with either VT7, VT7/VP3 or VT7/VP3-P1 (2 PFU/cell of each virus). Cultures were maintained in the absence (–) or presence (+) of IPTG. Apoptosis was measured using the Caspase-Glo 3/7 assay kit at 24 h.p.i. Each determination was carried out in triplicate. Presented data correspond to the mean \pm the standard deviation of three independent experiments. **B. Host cell protein synthesis.** The panel shows an autoradiography corresponding to the protein

synthesis profile obtained from cells infected with VT7/VP2 and coinfecting with VT7, VT7/VP3, or VT7/VP3-P1. Cultures were maintained in the presence of IPTG. At 24 h.p.i. cells were metabolically labeled with [35 S]methionine. Cell extracts were subjected to SDS-PAGE and autoradiography. The position of molecular mass markers is indicated (MW). Arrows indicate the position of bands corresponding to the VP2 polypeptide (black) and VP3 (grey). **C. PKR and eIF2 α phosphorylation.** Total cell extracts from IPTG-induced cells infected with VT7/VP2 and coinfecting with either VT7, VT7/VP3, or VT7/VP3-P1 were subjected to SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, and immunoblotted with serum anti-VP2, -VP3, -PKR, or -pT451 PKR. The WB corresponding to PKR was used as protein loading control. doi:10.1371/journal.pone.0046768.g005

As shown in Fig. 6A, cells infected with WR Δ E3L show a clear arrest of protein synthesis that is already detectable at 8 h.p.i. As it has been reported before [31], the shut off of protein synthesis detected in HeLa cells infected WR Δ E3L was also associated with the induction of cell death and the subsequent detachment of cells from the plastic culture surface (data not shown). Indeed, the WB carried out with anti-actin serum, used as a protein loading control, revealed that samples collected at 24 h.p.i. from WR Δ E3L-infected cultures were completely devoid of protein (Fig. 6B). In contrast, cultures infected with WR or WR Δ E3L/VP3 remained translationally active at 24 h.p.i. (Fig. 6A). WB analyses carried out with sera specific for the E3 and the VP3 polypeptides showed that, as expected, the WR Δ E3L/VP3 expresses the VP3 polypeptide but is deficient for the E3 protein (Fig. 6B), thus further confirming the genetic identity of this recombinant virus. The VACV D13 polypeptide is encoded by a gene belonging to the late temporal gene class, and was used here as a control of VACV late gene expression [49]. The WB carried out with anti-D13 serum (Fig. 6B) showed the presence of the D13 polypeptide in WR Δ E3L/VP3-cells, thus indicating that WR Δ E3L/VP3 is capable of completing a replication cycle within a cell system that is non-permissive for the parental WR Δ E3L virus. This observation is further supported by the finding that WR Δ E3L/VP3 exhibits a plaque size phenotype in HeLa cells akin to that of WR whilst the parental WR Δ E3L virus does not induce the formation of lysis plaques in this cell system (data not shown). Finally, the ability of WR Δ E3L/VP3 to productively replicate in HeLa cells was also analyzed by infecting these cells at an MOI of 0.1 PFU/cell. Cell samples were harvested at 24, 48 and 72 h.p.i., and used to determine virus titers in DF-1 cells. As an internal control for this experiment, infections and titrations were also carried out with WR and the deletion mutant WR Δ E3L viruses. The results of this analysis, shown in Fig. 5C, demonstrate that in contrast to WR Δ E3L, unable to grow in HeLa cells, the recombinant WR Δ E3L/VP3 efficiently replicates in HeLa cells, rendering virus titers similar to those observed in cells infected with WR. These results demonstrate that IBDV VP3 gene restores the ability of WR Δ E3L to productively infect HeLa cells.

Discussion

To gain further insight into the molecular events leading to the PCD response induced by the expression of the IBDV VP2 gene we have taken advantage of the VACV expression system. This system has been successfully applied to characterize the function of a wide variety of cellular and viral genes involved in apoptosis-related pathways [50]. Results presented here show that the shut off of protein synthesis and the apoptotic response induced by the expression of the IBDV VP2 gene in HeLa cells [26] are preceded by a conspicuous phosphorylation of two host cell polypeptides, namely PKR and eIF2 α , that play a critical role in the cellular responses against different types of stress, including those caused

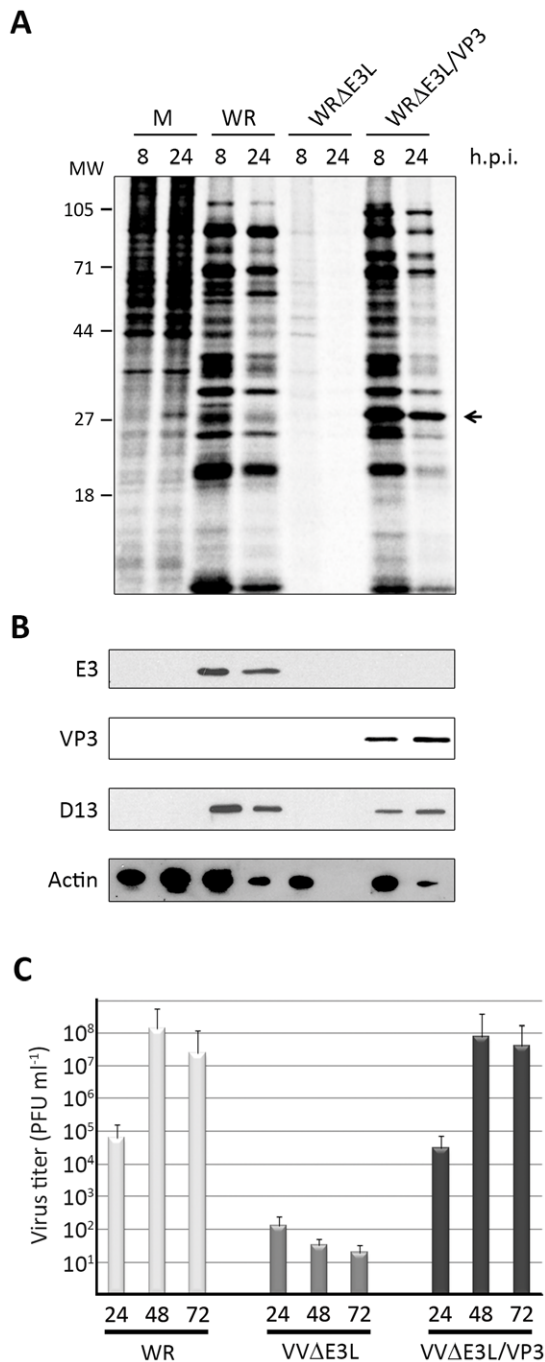


Figure 6. VP3 expression rescues the ability of the WRΔE3L to infect HeLa cells. A. Characterization of protein synthesis. HeLa cell monolayers were mock-infected (M) or infected (MOI 5 PFU/cell) with WR, WRΔE3L, or WRΔE3L/VP3. At the indicated times p.i. (h.p.i.), cells were metabolically labeled with [³⁵S]methionine. Cell extracts were subjected to SDS-PAGE and autoradiography. The band corresponding to the VP3 polypeptide is indicated by an arrow. **B. Immunodetection of relevant polypeptides.** Total cell extracts collected at 8 and 24 h.p.i. from mock and infected cultures were subjected to SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, and immunoblotted with serum anti-E3, -VP3, -D13, and -actin. The latter was used as a protein loading control. **C. Growth kinetics.** HeLa cells were infected (0.1 PFU/cell) with WR, WRΔE3L, or WRΔE3L/VP3. At the indicated times p.i. (h.p.i.) cell cultures were harvested and used to determine the virus titers in DF-1 cell monolayers.

doi:10.1371/journal.pone.0046768.g006

by viral infections [38]. Upon activation, PKR undergoes a major conformational rearrangement that leads to its homodimerization and autophosphorylation. Then, PKR dimers interact specifically with the translation initiation factor eIF2 α and, in a reaction mediated by the PKR kinase domain, phosphorylate eIF2 α at the S51 residue [51–53]. eIF2 α , together with the initiator Met-tRNAi^{Met} and GTP, participates in the selection of the translation start codon [54–55]. Phosphorylation of eIF2 α S51 blocks the exchange of eIF2-GDP to eIF2-GTP, thus abrogating translational initiation [56]. In addition to its role in the inhibition of protein synthesis, it has been reported that the presence of activated PKR increases the expression of several proapoptotic genes, including Fas and Bax [57]. PKR also induces apoptosis by other mechanisms entailing the activation of Fas-associated death domain/caspase 8 [57], p53 phosphorylation [58], and by modulating the activity of the nuclear factor κ B (NF- κ B) [59,60].

Our results show that the simultaneous expression of a non-phosphorylatable dominant negative mutant form of the PKR polypeptide together with VP2 prevents the activation of PKR and the subsequent eIF2 α phosphorylation, and thus thwarts the ensuing arrest of protein synthesis and PCD response in HeLa cells. Indeed, taken together, our results indicate that VP2 expression activates a PKR-mediated PCD response.

PKR is activated either by binding to dsRNA or through the interaction with different polypeptides [61]. It is difficult at this point to discriminate whether the activation of PKR observed in cells expressing VP2 is prompted by the VP2 polypeptide itself or by the accumulation of VP2 mRNAs. Taking into account results concerning the antiapoptotic activity of the RNA binding VP3 polypeptide discussed below, we favor the hypothesis that the activation of PKR observed in cells expressing VP2 is due to the accumulation of VP2 mRNAs.

We have previously shown that the proapoptotic effect associated to VP2 expression is not a direct consequence of the use of the VACV expression system (VACV VOTE) [32]. Indeed, a similar effect was observed in cells transfected with pcDNA-VP2, a derivative of the eukaryotic expression plasmid vector pcDNA3, in which the transcription of the VP2 ORF, under the control of the immediate-early promoter-enhancer region of the human cytomegalovirus (CMV), is driven by the host's RNA polymerase II [26]. Additionally, it has been documented that expression of other viral and cellular genes using the same VACV system, including that encoding the IBDV VP3 polypeptide described here, does not induce neither protein synthesis arrest nor PCD response in infected cells [26]. These previous results, confirmed in this report, rule out the hypothesis that VP2 might somehow sabotage the function of the VACV-encoded E3 polypeptide.

Imperfect RNA duplexes of sufficient double stranded character are capable to activate PKR [62], thus it has been shown that extended duplex regions within the 3' untranslated regions of mRNAs from some cytoskeletal proteins, i.e. tropomyosin, troponin and cardiac actin, interact with and activate PKR [63]. RNA fold predictions indicate the presence of large stretches of duplex in VP2 mRNAs. Accordingly, it seems feasible that the accumulation of VP2 mRNAs might be sufficient to trigger PKR activation.

The remarkable transcriptional efficiency of the VACV VOTE expression system makes it likely that the amount of VP2 mRNAs produced in cells infected with VT7/VP2 might outnumber available dsRNA-binding VACV E3 molecules, thus allowing the presence of enough “free” VP2 mRNAs to trigger PKR activation. Our results showing that, unlike the wild type VP3, the VP3MutPatch1 polypeptide lacking the ability to bind dsRNA is unable to prevent the apoptotic effect associated to VP2 expression

provides an indirect support to this hypothesis. Indeed, the precise mechanism by which VP2 expression triggers PKR phosphorylation deserves an in depth characterization. VP3 is the second major structural IBDV protein [64]. This polypeptide is released simultaneously with pVP2 and the VP4 protease following the autocatalytic processing of the IBDV polyprotein [18]. VP3 is a multifunctional polypeptide that acts as a scaffold during capsid assembly [65], recruits and activates the virus-encoded RdRp VP1 [66,67], and binds the dsRNA viral genome to build up the ribonucleoprotein (RNP) complexes that occupy the inner space of IBDV particles [13]. The results presented here show that VP3 efficiently precludes the protein synthesis arrest and the PCD response triggered by VP2 expression by inhibiting the activation of PKR and therein eIF2 α phosphorylation, and the activation of the apoptotic signaling cascade. The mechanism(s) by which VP3 prevents the VP2-induced activation of PKR remains to be elucidated. It has been shown that the VP3 only interacts with the C-terminal domain of the pVP2 precursor and not with the mature VP2 polypeptide [68]. This rules out a possible mechanism based upon the sequestration of the VP2 polypeptide via a direct VP2/VP3 interaction. Another possibility that we cannot discard at this point is that VP3 might prevent the PCD response via a direct or indirect interaction with the PKR polypeptide. In this regard, direct interaction with PKR of two well characterized proteins, VACV E3 and Influenza NS1, with antiapoptotic properties has been described [69,70]. This possibility will be investigated. Nonetheless, the ability of VP3 to bind both single stranded (ss)RNA, including a synthetic RNA produced by T7 polymerase transcription corresponding to the IBDV polyprotein ORF, and purified IBDV dsRNA genomic segments [46] and short (21 bp) dsRNA duplexes (unpublished results) suggests that the mechanism used by VP3 to control VP2-mediated PKR activation might involve the binding to VP2 mRNAs duplex regions, thus preventing their recognition by the PKR polypeptide. This hypothesis is strengthened by the finding that the expression of a mutant VP3 unable to bind dsRNA fails to prevent the phosphorylation of PKR induced by VP2 expression. Provided this hypothesis is correct, the presence of VP3 in both IBDV infected cells as well as in cells expressing the IBDV polyprotein might counteract the PKR-activating effect of mRNAs containing the VP2 coding region, thus precluding their proapoptotic effect.

It has been described that the VP3 polypeptide encoded by the infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), the prototype member of the *Birnaviridae* family, induces apoptosis via the Bad-mediated

mitochondria pathway in fish and mouse cells [71–73]. These observations strongly contrast with results described here showing the antiapoptotic role of its IBDV counterpart. The molecular basis underlying the differential behavior of the IBDV and IPNV VP3 polypeptides are at this point unknown and deserve a detailed analysis.

Data presented here conclusively show that the VP3 protein successfully replaces the VACV E3 polypeptide, restoring the ability of the VACV WR Δ E3L deletion mutant to replicate in the non-permissive HeLa cell line. Although a comparative analysis of the E3 and VP3 sequences did not reveal significant domain similarities amongst them (data not shown), the described data suggests that VP3 might play a role similar to E3 in IBDV-infected cells counteracting the host's innate antiviral response.

Birnaviruses exhibit some structural features that strongly differentiate them from all other icosahedral dsRNA viruses [74]. Prototypal dsRNA viruses, e.g. reoviruses, possess two concentric capsids, and their dsRNA genomes remain permanently enclosed within the innermost capsid, known as T = 2 core [75]. This structure provides the enzymatic machinery for the synthesis and extrusion of virus mRNAs, and shelters the dsRNA genome from cellular dsRNA sensors [76]. In contrast, birnaviruses possess a single capsid that encloses RNP complexes formed by the dsRNA segments covalently linked to the VPg form of the RdRp and wrapped up by VP3. At this point it is not known whether birnavirus particles are disassembled during the entry process. However, we have shown that purified IBDV RNPs are transcriptionally active [13]. This suggests the possibility that RNPs might be released and act as capsid-independent transcription complexes. In this putative scenario, the VP3 polypeptide might play a key role shielding the dsRNA against cellular dsRNA sensors and thus preventing the onset of dsRNA-mediated innate immune responses.

Acknowledgments

We thank various researchers who supplied reagents for the work; their names are listed in the text at appropriate locations.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: IB DR JFR. Performed the experiments: IB AMM DR JFR. Analyzed the data: IB DR JFR. Contributed reagents/materials/analysis tools: DR JFR. Wrote the paper: JFR.

References

1. Kepp O, Senovilla L, Galluzzi L, Panaretakis T, Tesniere A, et al. (2009) Viral subversion of immunogenic cell death. *Cell Cycle* 8: 860–9.
2. Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK (2006) Current concepts in apoptosis: the physiological suicide program revisited. *Cell Mol Biol Lett* 11: 506–25.
3. Festjens N, Cornelis S, Lamkanfi M, Vandenaebroeck P (2006) Caspase-containing complexes in the regulation of cell death and inflammation. *Biol Chem* 387: 1005–16.
4. Juo P, Kuo CJ, Yuan J, Blenis J (1998) Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr Biol* 8: 1001–8.
5. Yin XM (2006) Bid, a BH3-only multi-functional molecule, is at the cross road of life and death. *Gene* 369: 7–19.
6. Delmas B, Kibenge FS, Leong J, Mundt E, Vakharia VN, et al. (2005) Birnaviridae. In Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (eds), *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses*. Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier/Academic Press, London, UK. pp. 561–9.
7. van den Berg TP, Eterradossi N, Toquin D, Meulemans G (2000) Infectious bursal disease (Gumboro disease). *Rev Sci Tech* 19: 509–43.
8. Rodenberg J, Sharma JM, Belzer SW, Nordgren RM, Naqi S (1994) Flow cytometric analysis of B cell and T cell subpopulations in specific-pathogen-free chickens infected with infectious bursal disease virus. *Avian Dis* 38: 16–21.
9. Aricibasi M, Jung A, Heller ED, Rautenschlein S (2010) Differences in genetic background influence the induction of innate and acquired immune responses in chickens depending on the virulence of the infecting infectious bursal disease virus (IBDV) strain. *Vet Immunol Immunopathol* 135: 79–92.
10. Sharma JM, Kim IJ, Rautenschlein S, Yeh HY (2000) Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. *Dev Comp Immunol* 24: 223–35.
11. Böttcher B, Kiselev NA, Stel'Mashchuk VY, Perevozchikova NA, Borisov AV, et al. (1997) Three-dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy. *J Virol* 71: 325–30.
12. Mertens PP, Jamieson PB, Dobos P (1982) In vitro RNA synthesis by infectious pancreatic necrosis virus-associated RNA polymerase. *J Gen Virol* 59: 47–56.
13. Luque D, Saugar I, Rejas MT, Carrascosa JL, Rodríguez JF, et al. (2009) Infectious Bursal disease virus: ribonucleoprotein complexes of a double-stranded RNA virus. *J Mol Biol* 386: 891–901.
14. Lombardo E, Maraver A, Espinosa I, Fernández-Arias A, Rodríguez JF (2000) VP5, the nonstructural polypeptide of infectious bursal disease virus, accumulates within the host plasma membrane and induces cell lysis. *Virology* 277: 345–57.
15. Mundt E, Köllner B, Kretzschmar D (1997) VP5 of infectious bursal disease virus is not essential for viral replication in cell culture. *J Virol* 71: 5647–51.

16. Wu Y, Hong L, Ye J, Huang Z, Zhou J (2009) The VP5 protein of infectious bursal disease virus promotes virion release from infected cells and is not involved in cell death. *Arch Virol* 154: 1873–82.
17. Qin L, Qi X, Gao Y, Gao H, Lu X, et al. (2010) VP5-deficient mutant virus induced protection against challenge with very virulent infectious bursal disease virus of chickens. *Vaccine* 28: 3735–40.
18. Kibenge FS, Qian B, Cleghorn JR, Martin CK (1997) Infectious bursal disease virus polypeptide processing does not involve cellular proteases. *Arch Virol* 142: 2401–19.
19. Sánchez AB, Rodríguez JF (1999) Proteolytic processing in infectious bursal disease virus: identification of the polyprotein cleavage sites by site-directed mutagenesis. *Virology* 262: 190–9.
20. Irigoyen N, Garriga D, Navarro A, Verdaguier N, Rodríguez JF, et al. (2009) Autoproteolytic activity derived from the infectious bursal disease virus capsid protein. *J Biol Chem* 284: 8064–72.
21. von Einem UL, Gorbalenya AE, Schirmeier H, Behrens SE, Letzel T, et al. (2004) VP1 of infectious bursal disease virus is an RNA-dependent RNA polymerase. *J Gen Virol* 85: 2221–9.
22. Jungmann A, Nieper H, Müller H (2001) Apoptosis is induced by infectious bursal disease virus replication in productively infected cells as well as in antigen-negative cells in their vicinity. *J Gen Virol* 82: 1107–15.
23. Liu M, Vakharia VN (2006) Nonstructural protein of infectious bursal disease virus inhibits apoptosis at the early stage of virus infection. *J Virol* 80: 3369–77.
24. Li Z, Wang Y, Xue Y, Li X, Cao H, et al. (2012) Critical role for voltage-dependent anion channel 2 in infectious bursal disease virus-induced apoptosis in host cells via interaction with VP5. *J Virol* 86: 1328–38.
25. Wei L, Hou L, Zhu S, Wang J, Zhou J, et al. (2011) Infectious bursal disease virus activates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt signaling pathway by interaction of VP5 protein with the p85 α subunit of PI3K. *Virology* 417: 211–20.
26. Fernández-Arias A, Martínez S, Rodríguez JF (1997) The major antigenic protein of infectious bursal disease virus, VP2, is an apoptotic inducer. *J Virol* 71: 8014–8.
27. Fernández-Arias A, Risco C, Martínez S, Albar JP, Rodríguez JF (1998) Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *J Gen Virol* 79: 1047–54.
28. Haga IR, Bowie AG (2005) Evasion of innate immunity by vaccinia virus. *Parasitology* 130 Suppl: S11–25.
29. Perdiguer B, Esteban M (2009) The interferon system and vaccinia virus evasion mechanisms. *J Interferon Cytokine Res* 29: 581–98.
30. Chang HW, Watson JC, Jacobs BL (1992) The E3L gene of vaccinia virus encodes an inhibitor of the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 4825–9.
31. Chang HW, Uribe LH, Jacobs BL (1995) Rescue of vaccinia virus lacking the E3L gene by mutants of E3L. *J Virol* 69: 6605–8.
32. Ward GA, Stover CK, Moss B, Fuerst TR (1995) Stringent chemical and thermal regulation of recombinant gene expression by vaccinia virus vectors in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 6773–7.
33. Kaplan C (1989) Vaccinia virus: a suitable vehicle for recombinant vaccines? *Arch Virol* 106: 127–39.
34. Lee SB, Esteban M (1993) The interferon-induced double-stranded RNA-activated human p68 protein kinase inhibits the replication of vaccinia virus. *Virology* 193: 1037–41.
35. Brandt TA, Jacobs BI (2001) Both Carboxy- and Amino-Terminal Domains of the Vaccinia Virus Interferon Resistance Gene, E3L, Are Required for Pathogenesis in a Mouse Model. *J Virol* 75: 850–6.
36. Gherardi MM, Ramirez JC, Rodriguez D, Rodriguez JR, Sano G, et al. (1999) IL-12 delivery from recombinant vaccinia virus attenuates the vector and enhances the cellular immune response against HIV-1 Env in a dose-dependent manner. *J Immunol* 162: 6724–33.
37. Heljasvaara R, Rodriguez D, Risco C, Carrascosa JL, Esteban M, et al. (2001) The major core protein P4a (A10L gene) of vaccinia virus is essential for correct assembly of viral DNA into the nucleoprotein complex to form immature viral particles. *J Virol* 75: 5778–95.
38. García MA, Meurs EF, Esteban M (2007) The dsRNA protein kinase PKR: virus and cell control. *Biochimie* 89: 799–811.
39. Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, et al. (2000) Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* 6: 1099–108.
40. Dever TE (2002) Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell* 108: 545–56.
41. Ron D (2002) Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *J Clin Invest* 110: 1383–8.
42. Chen JJ (2007) Regulation of protein synthesis by the heme-regulated eIF2 α kinase: relevance to anemias. *Blood* 109: 2693–9.
43. Clemens MJ (2005) Translational control in virus-infected cells: models for cellular stress responses. *Semin Cell Dev Biol* 16: 13–20.
44. González-López C, Martínez-Costas J, Esteban M, Benavente J (2003) Evidence that avian reovirus sigmaA protein is an inhibitor of the double-stranded RNA-dependent protein kinase. *J Gen Virol* 84: 1629–39.
45. Guerra S, Abaitua F, Martínez-Sobrido L, Esteban M, García-Sastre A, et al. (2011) Host-range restriction of vaccinia virus E3L deletion mutant can be overcome in vitro, but not in vivo, by expression of the influenza virus NS1 protein. *PLoS One* 6: e28677.
46. Kochan G, Gonzalez D, Rodriguez JF (2003) Characterization of the RNA-binding activity of VP3, a major structural protein of Infectious bursal disease virus. *Arch Virol* 148: 723–44.
47. Beattie E, Kauffman EB, Martinez H, Perkus ME, Jacobs BL, et al. (1996) Host-range restriction of vaccinia virus E3L-specific deletion mutants. *Virus Genes* 12: 89–94.
48. Langland JO, Pettiford S, Jiang B, Jacobs BL (1994) Products of the porcine group C rotavirus NSP3 gene bind specifically to double-stranded RNA and inhibit activation of the interferon-induced protein kinase PKR. *J Virol* 68: 3821–9.
49. Lee-Chen GJ, Niles EG (1998) Map positions of the 5' ends of eight mRNAs synthesized from the late genes in the vaccinia virus HindIII D fragment. *Virology* 163: 80–92.
50. Gil J, Esteban M (2004) Vaccinia virus recombinants as a model system to analyze interferon-induced pathways. *J Interferon Cytokine Res* 24: 637–46.
51. Dey M, Cao C, Dar AC, Tamura T, Ozato K, et al. (2005) Mechanistic link between PKR dimerization, autophosphorylation, and eIF2 α substrate recognition. *Cell* 122: 901–13.
52. Dar AC, Dever TE, Sicheri F (2005) Higher-order substrate recognition of eIF2 α by the RNA-dependent protein kinase PKR. *Cell* 122: 887–900.
53. Taylor SS, Haste NM, Ghosh G (2005) PKR and eIF2 α : integration of kinase dimerization, activation, and substrate docking. *Cell* 122: 823–5.
54. Hershey JW (1991) Translational control in mammalian cells. *Annu Rev Biochem* 60: 717–55.
55. Majumdar R, Maitra U (2005) Regulation of GTP hydrolysis prior to ribosomal AU selection during eukaryotic translation initiation. *EMBO J* 24: 3737–46.
56. Sudhakar A, Ramachandran A, Ghosh S, Hasnain SE, Kaufman RJ, et al. (2000) Phosphorylation of serine 51 in initiation factor 2 α (eIF2 α) promotes complex formation between eIF2 α (P) and eIF2B and causes inhibition in the guanine nucleotide exchange activity of eIF2B. *Biochemistry* 39: 12929–38.
57. Balachandran S, Kim CN, Yeh WC, Mak TW, Bhalla K, et al. (1998) Activation of the dsRNA-dependent protein kinase, PKR, induces apoptosis through FADD-mediated death signaling. *EMBO J* 17: 6888–902.
58. Cuddihy AR, Wong AH, Tam NW, Li S, Koromilas AE (1999) The double-stranded RNA activated protein kinase PKR physically associates with the tumor suppressor p53 protein and phosphorylates human p53 on serine 392 in vitro. *Oncogene* 18: 2690–702.
59. Kumar A, Haque J, Lacoste J, Hiscott J, Williams BR (1994) Double-stranded RNA-dependent protein kinase activates transcription factor NF- κ B by phosphorylating I κ B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 6288–92.
60. Gil JJ, Alcamí J, Esteban M (1999) Induction of apoptosis by double stranded-RNA-dependent protein kinase (PKR) involves the α subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 and NF- κ B. *Mol Cell Biol* 19: 4653–63.
61. Williams BR (1999) PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene* 18: 6112–20.
62. Kaufman RJ (2000) The double-stranded RNA-activated protein kinase PKR. In Sonenberg N, Hershey JWB and Mathews MB (eds), *Translational Control of Gene Expression*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 503–28.
63. Nussbaum JM, Gunnery S, Mathews MB (2002) The 3'-untranslated regions of cytoskeletal muscle mRNAs inhibit translation by activating the double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR. *Nucleic Acids Res* 30: 1205–12.
64. Luque D, Rivas G, Alfonso C, Carrascosa JL, Rodríguez JF, et al. (2009) Infectious bursal disease virus is an icosahedral polyhedral dsRNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 2148–52.
65. Maraver A, Oña A, Abaitua F, González D, Clemente R, et al. (2003) The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical role in capsid assembly. *J Virol* 77: 6438–49.
66. Maraver A, Clemente R, Rodríguez JF, Lombardo E (2003) Identification and molecular characterization of the RNA polymerase-binding motif of infectious bursal disease virus inner capsid protein VP3. *J Virol* 77: 2459–68.
67. Garriga D, Navarro A, Querol-Audí J, Abaitua F, Rodríguez JF, et al. (2007) Activation mechanism of a noncanonical RNA-dependent RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 20540–5.
68. Oña A, Luque D, Abaitua F, Maraver A, Castón JR, et al. (2004) The C-terminal domain of the pVP2 precursor is essential for the interaction between VP2 and VP3, the capsid polypeptides of infectious bursal disease virus. *Virology* 322: 135–42.
69. Romano PR, Zhang F, Tan SL, Garcia-Barrio MT, Katze MG, et al. (1998) Inhibition of Double-Stranded RNA-Dependent Protein Kinase PKR by Vaccinia Virus E3: Role of Complex Formation and the E3 N-Terminal Domain. *Mol Cell Biol* 18: 7304–16.
70. Tan SL, Katze MG (1998) Biochemical and Genetic Evidence for Complex Formation Between the Influenza A Virus NS1 Protein and the Interferon-Induced PKR Protein Kinase. *J Interferon Cytokine Res* 18: 757–66.
71. Hong JR, Wu JL (2002) Induction of apoptotic death in cells via Bad gene expression by infectious pancreatic necrosis virus infection. *Cell Death Differ* 9: 113–24.
72. Hong JR, Huang IJ, Wu JL (2005) Aquatic birnavirus induces apoptosis through activated caspase-8 and -3 in a zebrafish cell line. *J Fish Dis* 28: 133–40.
73. Chiu CL, Wu JL, Her GM, Chou YL, Hong JR (2010) Aquatic birnavirus capsid protein, VP3, induces apoptosis via the Bad-mediated mitochondria pathway in fish and mouse cells. *Apoptosis* 15: 653–68.

74. Ahlquist P (2006) Parallels among positive-strand RNA viruses, reverse-transcribing viruses and double-stranded RNA viruses. *Nat Rev Microbiol* 4: 371–82.
75. Lawton JA, Estes MK, Prasad BV (2000) Mechanism of genome transcription in segmented dsRNA viruses. *Adv Virus Res* 55: 185–229.
76. Patton JT, Vasquez-Del Carpio R, Tortorici MA, Taraporewala ZF (2007) Coupling of rotavirus genome replication and capsid assembly. *Adv Virus Res* 69: 167–201.